

**QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON
SCHILDDRÜSENHORMONEN MIT DER
COMPETITIVEN PROTEINBINDUNGSANALYSE**

Jürgen Habermann

1974

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. E. BUCHBORN

QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SCHILDDRÜSENHORMONEN MIT DER
COMPETITIVEN PROTEINBINDUNGSANALYSE *

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
VERFASST UND EINER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von

Jürgen Habermann
aus Frankfurt/Main

München 1974

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
(SFB 51)



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. P.C. Scriba
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 3. 1974

Meine Eltern, die ich, wie ich schon
früher sagte, sehr lieb habe, sind
auch sehr glücklich, dass ich
hier bin.

MEINEN ELTERN

Meine Eltern, die ich, wie ich schon
früher sagte, sehr lieb habe, sind
auch sehr glücklich, dass ich
hier bin.

Meine Eltern, die ich, wie ich schon
früher sagte, sehr lieb habe, sind
auch sehr glücklich, dass ich
hier bin.

Herrn Professor Dr. med. P.C. SCRIBA
danke ich für die freundliche Über-
lassung des Themas und seine unermüd-
liche Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt
Herrn Dr. med. K. HORN, der diese
Arbeit tatkräftig unterstützte.

Besonders herzlich möchte ich
Frl. I. zur HORST danken, die einen
großen Teil der Versuche zur Thyroxin-
bestimmung mit viel Geschicklichkeit
und Ausdauer durchführte.

I N H A L T

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
1.	EINLEITUNG	1
2.	THEORIE DER COMPETITIVEN PROTEINBINDUNGSANALYSE	2
2.1.	Theoretische Grundlagen	2
2.2.	Nachweismöglichkeiten	2
3.	THYROXINBESTIMMUNG DURCH COMPETITIVE PROTEINBINDUNGSANALYSE	4
3.1.	Reagenzien und Säulenpräparation	4
3.1.1.	Reagenzien und Lösungen	4
3.1.2.	Säulenpräparation	5
3.2.	Methodische Vorversuche	6
3.2.1.	Hormonextraktion aus dem Serum	6
3.2.1.1.	Extraktion durch Alkohol	6
3.2.1.2.	Extraktion auf Ionenaustauschern	6
3.2.1.3.	Extraktion auf Dextrangelsäulen	7
3.2.1.3.1.	Durchführung	7
3.2.1.3.2.	Ergebnisse	7
3.2.2.	Hormonnachweis	9
3.2.2.1.	Durchführung	9
3.2.2.2.	Pufferlösungen	9
3.2.2.3.	TBG-Lösungen	10
3.2.2.4.	Radioaktive Tracer	10
3.2.2.5.	Ermittlung der optimalen TBG-Menge	12
3.2.2.5.1.	Theoretische Überlegungen	12
3.2.2.5.2.	Standard Eichkurven bei verschiedenen TBG-Konzentrationen	13
3.2.2.5.3.	Geeignete Volumina der TBG-Verdünnung	15
3.2.3.	Kombination von Hormonextraktion und Hormonnachweis auf einer Säule	17
3.2.3.1.	Durchführung	17
3.2.3.2.	Ergebnisse	17

<u>Kapitel</u>	<u>Seite</u>
3.2.3.2.1. Standardeichkurve in Puffer	17
3.2.3.2.2. Standardeichkurve in Nullserum	19
3.2.3.2.3. Standardeichkurve in Albuminlösung	21
3.2.3.2.4. Standardeichkurve nach Alkalisierung des Inkubationsansatzes	21
3.2.3.3. Diskussion	21
3.3. Automatisierung und Ergebnisse	23
3.3.1. Automatisierung	23
3.3.1.1. Automatisierung der Inkubation	23
3.3.1.2. Parallele simultane Säulen- chromatographie	23
3.3.1.2.1. Geräteaufbau	23
3.3.1.2.2. Durchführung	25
3.3.1.2.3. Berechnung	26
3.3.2. Ergebnisse	28
3.3.2.1. Statistische Qualitätskontrolle	28
3.3.2.1.1. Präzision in der Serie	28
3.3.2.1.2. Kapazität	28
3.3.2.1.3. Normalbereich	28
3.3.2.2. Klinische Ergebnisse	30
3.3.2.2.1. Diagnostische Wertigkeit	30
3.3.2.2.2. Spezifität	30
3.3.2.2.3. Vergleich von T_4 -CPBA und $PB^{127}I$	32
3.4. Diskussion	34
4. TRIJODTHYRONINBESTIMMUNG DURCH COMPETITIVE PROTEINBINDUNGSANALYSE	35
4.1. Einleitung	35
4.2. Reagenzien und Säulenpräparation	36
4.2.1. Reagenzien	36
4.2.2. Verwendete Ionenaustauscher	36
4.2.3. Verwendete Gele	36
4.2.4. Säulenpräparation	37

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
4.3.	Methodische Vorversuche	38
4.3.1.	Hormonextraktion aus dem Serum	38
4.3.2.	Trennung von T ₃ und T ₄	38
4.3.3.	Konzentrierung des T ₃ -Gipfels nach chromatographischer Trennung	40
4.3.3.1.	Anionenaustauscher	40
4.3.3.2.	Kationenaustauscher	40
4.3.3.3.	Dextrangele	40
4.3.4.	Hormonnachweis	42
4.3.4.1.	Inkubationsansatz	42
4.3.4.2.	Trennung B/F	42
4.3.4.2.1.	Dextrangele	42
4.3.4.2.2.	Biogele	42
4.3.4.2.3.	Pufferlösungen	44
4.3.4.2.4.	TBG-Lösungen	47
4.3.4.2.5.	Temperaturabhängigkeit	49
4.3.4.3.	Berechnung	49
4.3.5.	Konzentrierschritt mit nachfolgender T ₃ -CPBA	50
4.3.5.1.	T ₃ -CPBA direkt auf der Konzentriersäule	50
4.3.5.2.	Elution von der Konzentriersäule mit Einengen	52
4.3.5.2.1.	Anionenaustauscher	52
4.3.5.2.2.	Kationenaustauscher	52
4.3.5.2.3.	Sephadex LH-20	54
4.3.5.3.	Elution von der Konzentriersäule und CPBA im geschlossenen System	54
4.3.5.3.1.	Konzentriersäule	55
4.3.5.3.2.	Adsorption des T ₃ auf Dextrangelsäulen	57
4.3.5.3.3.	T ₃ -Nachweis nach Adsorption auf Dextrangel	57
4.3.5.4.	Diskussion	59
4.4.	Halbautomatische Bestimmung von Trijodthyronin im Serum	60

<u>Kapitel</u>		<u>Seite</u>
4.4.1.	Extraktion aus dem Serum	60
4.4.2.	Auftrennung von T_3 und T_4	60
4.4.3.	Konzentrierung der T_3 -Peaks	62
4.4.4.	Nachweis von T_3 mit der CPBA	62
4.4.5.	Auswertung	64
4.4.5.1.	Erstellen von Eichkurven	64
4.4.5.2.	Berechnung	64
4.5.	Ergebnisse	65
4.5.1.	Qualitätskontrolle	65
4.5.1.1.	Blancprobleme	65
4.5.1.2.	Störung durch endogenes T_4	67
4.5.1.3.	Präzision in der Serie	67
4.5.1.4.	Reproduzierbarkeit	67
4.5.1.5.	Normalbereich	69
4.5.1.6.	Störfaktoren	69
4.5.2.	Klinische Ergebnisse und Diskussion	70
4.5.2.1.	Dekompensierte autonome Adenome mit erhöhtem T_4 -Spiegel	70
4.5.2.2.	Dekompensierte autonome Adenome mit normalem T_4 -Spiegel	71
4.5.2.3.	Kompensierte autonome Adenome	72
4.5.2.4.	Hyperthyreosen	72
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
5.1.	Thyroxinbestimmung	76
5.2.	Trijodthyroninbestimmung	76
	LITERATURVERZEICHNIS	77
	LEBENS LAUF	

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

CPBA	competitive Proteinbindungsanalyse
T ₃	3, 3', 5-Trijod-L-Thyronin- ¹²⁷ Jod
T ₄	L-Thyroxin- ¹²⁷ Jod
T ₃ - ¹²⁵ J	Trijod-L-Thyronin- ¹²⁵ Jod
T ₄ - ¹²⁵ J	L-Thyroxin- ¹²⁵ Jod
PB ¹²⁷ I	Protein Bound ¹²⁷ Iodine
TBG	Thyroxin bindendes Globulin
TBA	Thyroxin bindendes Albumin
TBPA	Thyroxin bindendes Präalbumin
TSH	Thyreotropin
TRH = TRF	Thyreotropin releasing factor
IPM	Impulse pro Minute
mCi	Milli-Curie
µg, ng	Mikrogramm, Nanogramm
F	freier Hormonanteil
%F	prozentualer freier Hormonanteil
B	gebundener Hormonanteil
%B	prozentualer gebundener Hormonanteil
M, N	Molar, Normal
$\bar{x}$	Mittelwert
s	Standardabweichung

1. EINLEITUNG

Die niedrigen Konzentrationen der Schilddrüsenhormone im Serum machen empfindliche und spezifische Nachweisverfahren erforderlich (27,28,58,63). Zwar ist die Messung des proteingebundenen Jods (PB ^{127}I) sehr empfindlich (2,36, 37) und heute automatisiert, aber durch Röntgenkontrastmittel und andere jodhaltige Verbindungen sehr störanfällig und damit unspezifisch (76). Die Verfahren mit der kompetitiven Proteinbindungsanalyse dagegen sind bisher einerseits wenig automatisiert und somit auch wenig standardisiert und zeitaufwendig, andererseits aber für den Routinebetrieb zu teuer (6,9,11,51,69,75). Ferner sind für diese Tests meist größere Serummengen erforderlich, was mit Nachteilen in der Kinderklinik und bei Tierexperimenten verbunden ist.

Es galt nun eine Nachweismethode für Thyroxin zu entwickeln, die die Empfindlichkeit der Jodbestimmung mit der Spezifität der kompetitiven Proteinbindungsanalyse vereint. Aufgrund der Erfahrungen, die bei der Automatisierung und Standardisierung des T_3 -in vitro-Tests gewonnen wurden, erschien es aussichtsreich, einen T_4 -Test an dem gleichen Versuchsmodell (42,68) und auf der gleichen schon automatisierten Apparatur aufzubauen (25,34).

Nicht alle Schilddrüsenfunktionszustände lassen sich mit der konventionellen Laboratoriumsdiagnostik (PB ^{127}I , T_4 (CPBA), T_3 -in vitro-Test) erfassen (31). So wurden in der letzten Zeit Fälle von T_3 -Thyreotoxikosen publiziert (5,71): Als Ursache der klinischen Symptomatik einer Hyperthyreose fanden sich bei normalem Gesamtthyroxin und normalem T_3 -in vitro-Test deutlich erhöhte T_3 -Spiegel. Normalerweise liegt im Serum T_4 in ca. 40fach höherer Konzentration als T_3 vor. Das Ziel unserer Bemühungen war der Aufbau einer spezifischen Methode zur Bestimmung von Trijodthyronin im Serum zur Suche nach weiteren Krankheitsbildern mit gestörter Relation von T_3 und T_4 .

2. THEORIE DER COMPETITIVEN PROTEINBINDUNGSANALYSE

2.1. Theoretische Grundlagen

Das Prinzip der Sättigungsanalyse zur spezifischen Bestimmung von Serumhormonspiegeln wurde 1960 erstmals von EKINS beschrieben. Hierbei wird zu dem Serum, dessen Hormongehalt bestimmt werden soll, eine standardisierte Menge radioaktiv markierten Hormons gegeben und durch Vermischung eine gleiche Verteilung zwischen exogenem radioaktivem und endogenem Hormon hergestellt. Nun erfolgt die Inkubation mit einem, dieses Hormon bindenden Acceptor, dessen Bindungsstellen begrenzt sind und somit nur einen Teil des Hormons binden können. Dann ist das Verhältnis von gebundenem und ungebundenem radioaktivem Hormon direkt abhängig von der gesamten Hormonmenge. Nach Auftrennung der gebundenen (B) und der ungebundenen Fraktion (F) und deren separater Radioaktivitätsmessung kann der endogene Hormongehalt des Serums aus dem prozentualen Verhältnis von B und F an Hand einer Standard-eichkurve ermittelt werden (20).

Die wichtigsten Grundvoraussetzungen dieses Modells sind also folgende:

1. der Acceptor muß das Hormon möglichst spezifisch binden,
2. der Acceptor kann zwischen endogenem und radioaktivem exogenem Hormon nicht unterscheiden,
3. radioaktives und kaltes Hormon konkurrieren gleichberechtigt bis zur Einstellung eines Gleichgewichts um die gleichen Bindungsstellen.

2.2. Nachweismöglichkeiten

Dieses Prinzip der Sättigungsanalyse läßt sich nun vielfach abwandeln. Wird als Acceptor ein Protein verwendet, so spricht man von einer "competitiven Proteinbindungsanalyse"(CPBA) (48,49).

Eine weitere Unterteilung erfolgt nach der Art des verwendeten Proteins. So können als Acceptoren Antikörper, Enzyme, Serum- und Gewebsproteine eingesetzt werden. Für die competitive Proteinbindungsanalyse des Thyroxins bieten sich als Acceptoren T_4 -Antikörper oder bindende Serumproteine an. Obwohl Antikörper eine äußerst hohe Spezifität zum entsprechenden Antigen besitzen, hat sich ein Nachweis mit einem Antikörper gegen Thyroxin (T_4 -Radioimmunoassay) als Routinemethode noch nicht durchsetzen können, da eine Automatisierung und Standardisierung dieses Verfahrens wegen der starken Proteinbindung des Thyroxins und der deshalb erforderlichen Hormonextraktion aus dem Serum schwierig ist. Andere mögliche Acceptoren sind Serumproteine, die T_4 binden (38), also das Thyroxin bindende Globulin (TBG), das Thyroxin bindende Präalbumin (TBPA) und das Thyroxin bindende Albumin (TBA). So wird auch von den meisten Autoren das TBG als Acceptor verwendet (6,9,11,50,51,69).

Die Trennung von proteingebundenem und ungebundenem Hormon erfolgt durch Adsorption des freien Anteils an Ionenaustauscher oder Dextrangel.

3. THYROXINBESTIMMUNG DURCH COMPETITIVE PROTEINBINDUNGSANALYSE

3.1. Reagenzien und Säulenpräparation

3.1.1. Reagenzien und Lösungen

Als radioaktive Hormone wurden Liothyronine-¹²⁵J (3, 5, 3'-Trijod-L-Thyronin), 20 - 50 mCi/mg und L-Thyroxine-¹²⁵J, 20 - 50 mCi/mg, jeweils in 50% (v/v) wässriger Propylenglykollösung (Fa. Radiochemical Center, Amersham) verwendet. Die radioaktiven Lösungen wurden mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 500 ml verdünnt und bis zur Verwendung bei +4°C aufbewahrt. Wichtig ist ein Proteinzusatz (0,25% Rinderalbumin, Pentex^R, Fa. Roth, Karlsruhe) zur Verhinderung der Wandadsorption der Schilddrüsenhormone in den Glas- und Plastikgefäßen.

Stabiles L-Thyroxin purum (Fa. Fluka AG., Buchs) wurde in ca. 25 ml 1N Natronlauge gelöst und mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer mit 1%igem Rinderalbuminzusatz (Pentex^R, Fa. Roth, Karlsruhe) auf die Endverdünnung gebracht (0 - 20 µg T₄-¹²⁷J/100 ml).

Die Pufferlösungen wurden in der benötigten Molarität hergestellt und unter Kontrolle eines pH-Meters auf den gewünschten pH-Wert gebracht (16).

Als "TBG-Lösung" wurde gepooltes Serum von Schwangeren (TBG-reiches Serum),

als Nachwaschserum Restserum aus der klinischen Chemie und

als Normalserum gepooltes Serum von euthyreoten Patienten verwendet.

Die untersuchten Seren wurden frisch oder aufgetaut nach Lagerung bei -25°C bestimmt.

Als schilddrüsenhormonfreies Serum (Nullserum) eignete sich Serum von strumektomierten und ¹³¹J-behandelten Pa-

tienten (Struma maligna), deren T_3 -Substitutionsbehandlung zur Durchführung eines Radiojodtests mindestens 6 Tage unterbrochen war.

3.1.2. Säulenpräparation

Die Dextrangeltrockensubstanzen Sephadex G-10, Sephadex G-25 fine und superfine, Sephadex G-50 superfine (Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden) wurden über Nacht in Wasser gequollen und das Gel nun folgendermaßen in die Säulen gefüllt:

Vor den Auslauf der Zylinder von 5 ml Einmalspritzen (Fa. Braun, Melsungen) wurden feinporige Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen) gelegt (s. Abbildung 6a) und diese Säulen mit der entsprechenden Menge Dextrangel-Wasser-Suspension bei verschlossenem Auslauf gefüllt. Nach Sedimentation des Gels wurden die Wasserüberstände abgesaugt und die Säulen mit Elutionslösung gespült (15,22).

3.2. Methodische Vorversuche

3.2.1. Hormonextraktion aus dem Serum

3.2.1.1. Extraktion durch Alkohol

Die starke Eiweißbindung des zu über 99% proteingebundenen Thyroxins macht eine vorherige Extraktion des Hormons aus dem Serum zur Durchführung der CPBA unbedingt erforderlich. Die meistbenutzte Methode ist die Hormonextraktion mit konzentriertem Alkohol (45). Das ausgefallene, denaturierte Protein wird abzentrifugiert und ein Aliquot des Alkoholüberstandes in einem Wärmebad unter Stickstoffdurchströmung eingedampft. Hierbei wird eine Extraktionsrate von ca. 80% erreicht, deren Standardisierung allerdings schwierig ist (6). Zu diesen methodischen Fehlern addieren sich noch Fehler, die durch das Umpipettieren des Alkoholextraktes und den Hormonverlust beim Einengen entstehen. Ferner ist durch die Zentrifugier- und Eindampfschritte eine Automatisierung und damit Standardisierung dieser Methode schwierig.

3.2.1.2. Extraktion auf Ionenaustauschern

Die Extraktion des Hormons auf Ionenaustauschersäulen ist ebenfalls möglich und wird z.B. der chromatographischen Trennung von T_3 und T_4 vorgeschaltet (s. 4.3.1.), wobei je nach Wahl des Austauschers eine Extraktionsrate von über 90% erreicht werden kann. Da aber das Eluat vom Austauscher ebenfalls eingeengt werden muß, bringt diese Methode gegenüber der Alkoholextraktion keine wesentlichen Vorteile.

3.2.1.3. Extraktion auf Dextrangelsäulen

Da einerseits die Proteinormonbindung sowohl bei saurem, wie auch alkalischem pH-Wert gelöst wird, andererseits Dextrangel das Thyroxin infolge seiner aromatischen Struktur adsorbiert (53), während Proteine unverzögert das äußere Volumen des Gelbettes durchwandern, ist es möglich, Thyroxin auf einer sauer oder alkalisch vorgespülten Dextrangelsäule von den Serumproteinen abzutrennen. Die Trennung von TBG-gebundenem (B) und freiem T_4 (F) kann ebenfalls auf Dextrangel durchgeführt werden, so daß es theoretisch möglich erscheint, Hormonextraktion und Hormonnachweis durch competitive Proteinbindungsanalyse auf den gleichen Säulen zu vollziehen.

3.2.1.3.1. Durchführung

Zur Ermittlung der optimalen Hormonabtrennung wurden vier 1 g Sephadex G-25 superfine-Säulen (4,5 ml Gelvolumen) mit 0,1 N und 0,02 N Natronlauge bzw. Salzsäure gespült. Dann wurde auf jede Säule mit einer Peristaltikpumpe (Pumpvolumen 0,42 ml/min) ein Inkubationsgemisch aus 0,1 ml Serum, 0,2 ml T_4 - ^{125}J und 0,2 ml 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 aufgetragen und anschließend mit Barbitalpuffer umgepuffert und eluiert. Die Eluate der einzelnen Säulen wurden in kleinen Fraktionen gesammelt und im Gammazähler gemessen.

3.2.1.3.2. Ergebnisse

Von einer mit 0,02 N Salzsäure vorgespülten Säule wurde das auf diese Säule aus dem Serum extrahierte T_4 nur wenig verzögert und gleich nach dem nun hormonfreien Protein- und Jodidpeak eluiert, während die mit 0,02 N Natronlauge gespülte Säule nach 80 Minuten noch alles Hormon adsorbiert

hielt. Auf alkalisierten Dextrangelsäulen wird also T_4 wesentlich besser aus der Serumproteinbindung freigesetzt als auf saurem Gel, was durch die Abnahme der Bindungskapazität des TBG mit steigendem pH verstanden werden kann (13).

Während sich das auf Sephadex G-10 extrahierte Hormon auch mit einem Überschuß von unverdünntem Serum nicht mehr vom Gel entfernen läßt, reicht die Adsorptionskraft des schwächer vernetzten G-50 nicht aus, so daß das vom Serum abgetrennte Hormon sofort nach der Proteinfraction eluiert wird.

Die Verwendung von geringeren Mengen als 1 g G-25 superfine erwies sich unter diesen Bedingungen als nicht ausreichend für die vollständige Freisetzung von T_4 aus der Serumproteinbindung.

Da die Einstellung des Gleichgewichts von T_4 zwischen Sephadex und Serumprotein sehr schnell erfolgt, brachte auch eine Verminderung der Pumpgeschwindigkeit keine bessere Abtrennung.

3.2.2. Hormonnachweis

3.2.2.1. Durchführung

Zur Frage, ob auf denselben Säulen, auf denen T_4 aus dem Serum extrahiert wird, auch die CPBA durchgeführt werden kann, wurden folgende Vorversuche unternommen:

Die 1 g Sephadex G-25 superfine-Säulen wurden mit 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 äquilibriert und das Inkubationsgemisch von 0,2 ml radioaktivem Tracer (T_3 - ^{125}J oder T_4 - ^{125}J), 0,2 ml kaltem T_4 -Standard und 0,2 ml Barbitalpuffer mit der oben erwähnten Peristaltikpumpe (Pumpvolumen 0,42 ml/min) auf die Säulen gepumpt. Dann wurde 15 Minuten lang Barbitalpuffer gespült, was der Umpufferzeit vom pH der Natronlauge auf den pH des Puffers entspricht (s. 3.2.1.3.1.). Nun konnte die TBG-Lösung kontinuierlich in vier Minuten angesaugt und über die Säule gepumpt werden, so daß sich im Gel die konkurrierende Bindung des kalten und des radioaktiven Hormons an den Bindungsstellen des TBG vollziehen konnte. Durch Nachspülen mit Barbitalpuffer wurde der TBG-gebundene Anteil (B) eluiert und in einem Glas gesammelt, während der ungebundene, auf der Säule verbliebene Anteil (F), wie beim T_3 -in vitro-Test, mit einem Überschuß an unverdünntem Kontrollserum quantitativ heruntergewaschen und ebenfalls gesammelt wurde.

3.2.2.2. Pufferlösungen

Durch Verwendung von 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 konnte auch beim T_4 -Nachweis, wie auch später für die T_3 -CPBA gezeigt wird (s. Abbildung 14), eine wesentlich steilere Eichkurve erzielt werden, als mit Natriumbarbitalpuffer oder Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (s. 4.3.4.2.3.).

3.2.2.3. TBG-Lösungen

Um die zeitaufwendige und komplizierte Isolierung von reinem TBG (47), das meist als Acceptor verwendet wird (6,9,11,51,69), zu umgehen, wurde versucht, einfach mit verdünntem TBG-reichen Serum zu arbeiten, da die Thyroxinbindung an Thyroxin bindendes Präalbumin (14,44) durch Verwendung von Barbitalpuffer pH 8,6 und an Thyroxin bindendes Albumin (72,74) durch Verdünnung deutlich vermindert wird, sodaß als bindendes Protein vorwiegend das TBG wirksam ist (24). Als TBG-reiches Serum bietet sich hierbei ein Serum von schwangeren oder östrogenbehandelten Frauen an (18).

Weitere Versuche, das TBG-reiche Serum durch Chromatographie über Kationen- oder Anionenaustauscher von endogenem T_4 zu befreien oder durch Trijodthyronin-Substitutionsbehandlung bei östrogentherapierten Patientinnen das endogene T_4 zu ersetzen, brachten keine wesentlichen Vorteile (s. 4.3.4.2.4.).

3.2.2.4. Radioaktive Tracer

Als radioaktiven Tracer bieten sich sowohl radioaktives Trijodthyronin als auch Thyroxin an.

Wird das Schwangerenserum mit T_3 - ^{125}J inkubiert und über die Säule gepumpt, so verdrängt das auf der Säule vorher aus dem Patientenserum extrahierte und adsorbierte T_4 das radioaktive T_3 aus seiner Proteinbindung und zwar in Abhängigkeit von der Menge des Thyroxins. Das Prinzip dieser Methode wäre also nicht die CPBA, sondern eine Verdrängungsanalyse.

Wird dagegen das zu bestimmende Serum mit T_4 - ^{125}J inkubiert und auf der Säule exogenes und endogenes Hormon aus dem Serum extrahiert, so konkurrieren endogenes und zugeführtes radioaktives Hormon gleichberechtigt um die TBG-

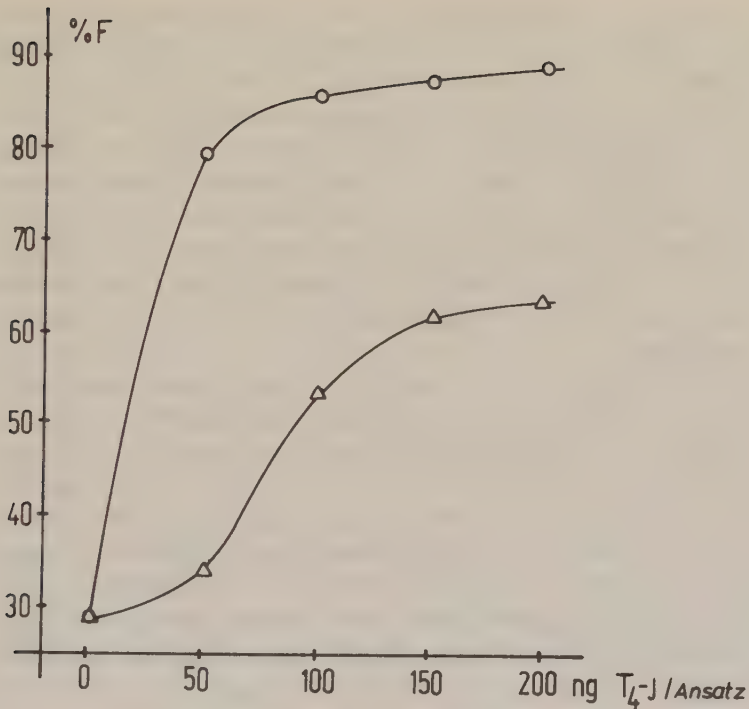


Abb.1: Vergleich der T_4 -Standard Eichkurven bei Verwendung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J als Tracer

Die Abbildung zeigt Eichkurven von 0 - 200 ng T_4 - J pro Ansatz. Bei der einen Eichkurve (Δ — Δ) wurde zur Trennung von B und F mit T_3 - ^{125}J inkubiertes TBG-reiches Serum (1:8 verdünnt) verwendet. Für die andere Kurve (O—O) wurden die kalten T_4 -Eichstandards mit T_4 - ^{125}J inkubiert und zur B/F-Trennung 1:50 verdünntes TBG-reiches Serum verwendet.

Valenzen. Hier wird also exakt das Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse durchgeführt (s. 2.1.).

Wie ein Vergleich beider Eichkurven zeigt (Abbildung 1), ist die Eichkurve nach der CPBA-Technik wesentlich steiler

als die der Verdrängungsanalyse. Der Grund hierfür liegt darin, daß Trijodthyronin schwächer als T_4 an das TBG gebunden ist. Deshalb kann man das TBG-Serum nicht so stark verdünnen, da sonst schon ohne Anwesenheit von Thyroxin auf der Säule ein großer Teil des radioaktiven T_3 als freier Anteil vorliegt, d.h. die Eichkurve einen viel zu hohen Nullpunkt besitzt. Die Empfindlichkeit der Eichkurve ist aber, wie unten ausführlich beschrieben (s. 3.2.2.5.), im Wesentlichen von dem Verdünnungsgrad der TBG-Lösung abhängig, sodaß eine möglichst starke Verdünnung angestrebt werden muß.

Auch die Verdünnung des radioaktiven T_4 beeinflusst den Verlauf der Eichkurve, da mit dem Tracer, bedingt durch die relativ niedrige spezifische Aktivität, auch kaltes T_4 mit in den Testansatz gebracht wird. Eine Verdünnung der T_4 - ^{125}J -Standardlösung (s. 3.1.1.) um das Fünffache bewirkt eine Parallelverschiebung in unserem System um ca. 10% des freien Anteils nach unten. Bei den folgenden Versuchen wurde deswegen, wenn nicht anders angegeben, 1:5 verdünnte T_4 - ^{125}J -Standardlösung dem Inkubationsgemisch zugesetzt.

3.2.2.5. Ermittlung der optimalen TBG-Menge

3.2.2.5.1. Theoretische Überlegungen

Wie schon unter 2.1. beschrieben, müssen die Bindungsstellen des Acceptorproteins begrenzt sein, sodaß nur ein Teil des vorhandenen Hormons gebunden werden kann. Dies bedeutet aber, daß der Nachweis um so empfindlicher wird, je weniger Bindungsstellen im Ansatz sind, oder je verdünnter die TBG-Lösung ist.

Nimmt man für ein Normalserum $2,6 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ Bindungsstellen des TBG an (1,8,59) und für Schwangerenserum eine 2,5-

fache Kapazität (18), so befinden sich in 1 ml Schwangerenserum bei einer Verdünnung von 1:50 ca. $1,04 \times 10^{-11}$, bei 1:20 $2,6 \times 10^{-11}$ und bei 1:10 $5,2 \times 10^{-11}$ freie Bindungsstellen pro ml Ansatz, d.h. Bindungsstellen des TBG nach Abzug der mit endogenem T_4 besetzten Valenzen. Daraus ergibt sich theoretisch, daß bei einem Zusatz von 20 ng T_4 -J ($= 4 \times 10^{-11}$ mol T_4) in 1 ml der 1:50 Verdünnung 75% und in der 1:20 Verdünnung 35% als freies T_4 vorliegt, während in der 1:10 Verdünnung noch alles T_4 an das TBG gebunden ist. Mit anderen Worten: die Eichkurve ist zwischen 0 und 20 ng T_4 -J bei einer 1:50 Verdünnung des Schwangerenserums recht gut empfindlich, während sie bei einer 1:20 Verdünnung schon recht flach ist und dagegen bei der 1:10 Verdünnung keine Eichkurve mehr zustande kommt.

Nun kann aber die TBG-Lösung nicht beliebig stark verdünnt werden, und somit der Nachweis beliebig empfindlich gemacht werden, denn beim Durchwandern des Schwangerenserums durch die Sephadexsäule wird dem TBG durch das competitive Verhalten des Dextrangels mit dem TBG um die Bindung des T_4 wieder T_4 entzogen, so daß der gemessene freie, dextrangelgebundene Anteil an T_4 nicht dem wirklich freien dialysierbaren Anteil entspricht. Es wird hierbei also, ähnlich wie beim T_3 -in vitro-Test, die Bindungskapazität der TBG-Lösung gemessen, die bei Zunahme an zugeführtem T_4 abnimmt. So ergibt sich auch ohne Zusatz von kaltem T_4 (abgesehen vom Thyroxingehalt der Radioaktivität) in 1 ml einer 1:50 Verdünnung eines Schwangerenserums auf 1 g Sephadex G-25-Säulen schon ein freier Anteil von 30%, bei 1:20 von 7% und bei 1:10 von 5%.

3.2.2.5.2. Standardeichkurven bei verschiedenen TBG-Konzentrationen

Abbildung 2 zeigt die experimentell gewonnenen Eichkurven bei verschiedenen Verdünnungen des TBG-reichen Serums.

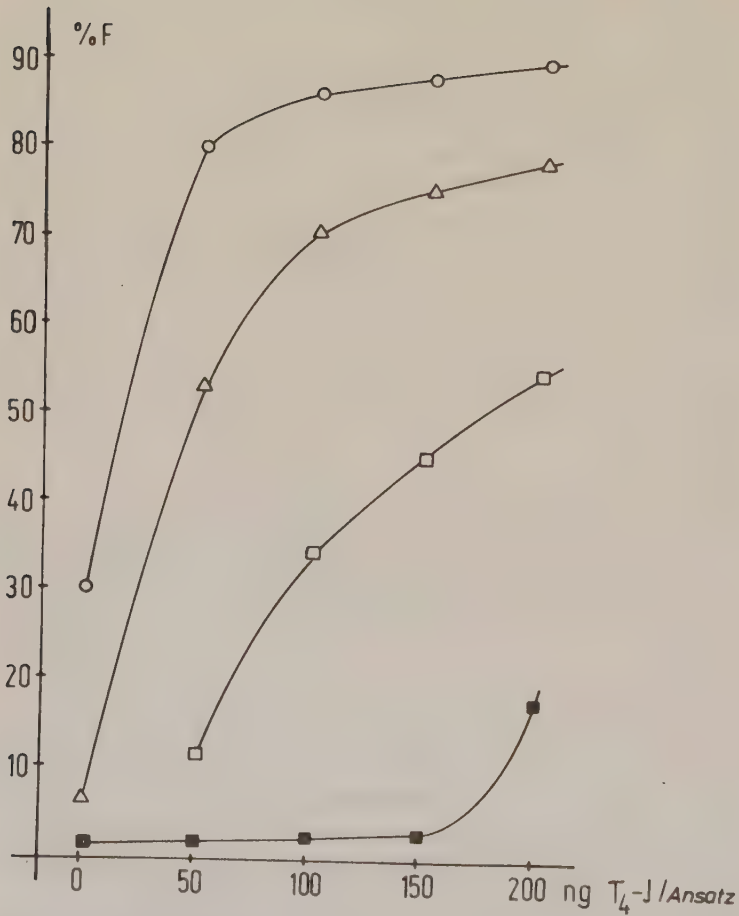


Abb.2: T₄-Standardeichkurven in Abhängigkeit von der Verdünnung des TBG-reichen Serums

In der Abbildung sind die Eichpunkte von 0, 50, 100, 150 und 200 ng T₄-J bei Verwendung des TBG-reichen Serums in Verdünnungen von 1:50 (○—○), 1:20 (△—△), 1:10 (□—□) und 1:5 (■—■) dargestellt.

Es ergibt sich somit eine gute Übereinstimmung zwischen den theoretischen Überlegungen und den experimentell gewonnenen Ergebnissen. Das beweist, daß der dextrangelgebundene Anteil an T_4 , entsprechend dem sogenannten freien T_3 des T_3 -in vitro-Tests, ein gutes Maß für den wirklich freien, dialysierbaren Anteil ist.

3.2.2.5.3. Geeignete Volumina der TBG-Verdünnung

Nach Auftragen von 0 ng bzw. 2,5 ng T_4 -J-Standard wurde hier mit 1:80 verdünntem Schwangerenserum mit verschiedenen Volumina von 1 - 1,8 ml eluiert.

Wie die Abbildung 3 zeigt, nimmt der %F-Wert von 0 ng bzw. 2,5 ng T_4 -Eichstandard mit steigendem Volumen ab. Trotz der geringfügigen Abnahme der Steilheit der Eichkurve, wie man aus der Differenz beider Kurven sieht, empfiehlt es sich, in dem Bereich von 1,5 ml TBG-Serum zu arbeiten, da hier geringgradige Unterschiede der pro Zeiteinheit angesaugten TBG-Volumina, bedingt durch die Toleranzen der Peristaltikpumpe und der Proportionierschläuche kaum ins Gewicht fallen.

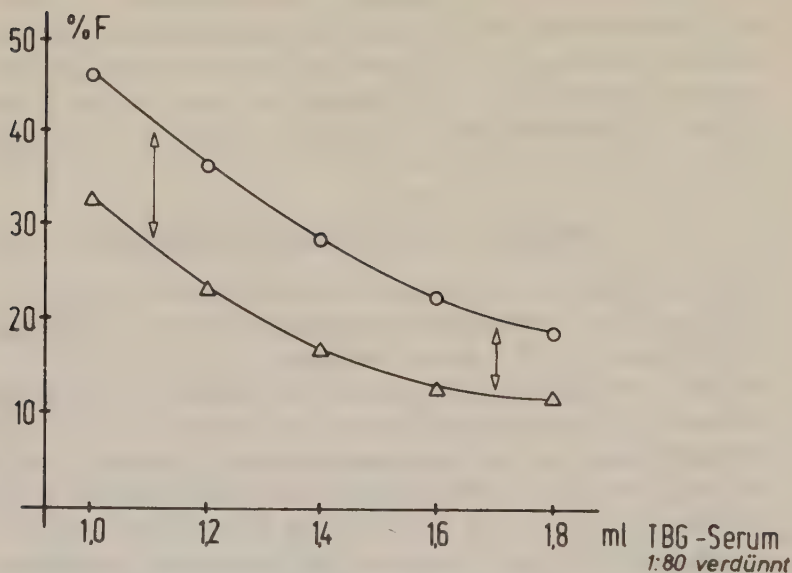


Abb. 3: Abhängigkeit der %F-Rate von der Menge des TBG-reichen Serums

Die Abbildung zeigt die %F-Rate von Eichstandards mit 0 ng T₄-J (Δ—Δ) und 2,5 ng T₄-J (○—○) bei Verwendung von 1,0, 1,2, 1,4, 1,6 und 1,8 ml eines 1:80 verdünnten TBG-reichen Serums. Die Abnahme der Empfindlichkeit der Eichkurve bei Zunahme der Serummenge ist durch die beiden senkrechten Pfeile dargestellt.

Eine langsamere Pumpgeschwindigkeit von 0,21 statt 0,42 ml/min, mit der 1,5 ml des 1:80 verdünnten TBG-reichen Serums über das Dextrangel gepumpt wurden, brachte keine Veränderung der Eichkurve. Dieses Verhalten spricht für eine rasche Einstellung des Gleichgewichts von T₄ zwischen TBG und Dextrangel (s. 3.2.1.3.2.).

3.2.3. Kombination von Hormonextraktion und Hormonnachweis auf einer Säule

Nach den erfolgreichen Versuchen sowohl der T_4 -Extraktion aus dem Serum, als auch der CPBA jeweils auf Dextrangsäulen, galt es nun, diese Schritte miteinander zu verknüpfen.

3.2.3.1. Durchführung

Nach Vorspülung der 1 g Sephadex G-25 superfine-Säulen mit 0,02 N Natronlauge, wurde das jeweilige Inkubationsgemisch (0,1 ml T_4 - ^{127}J -Standard, 0,2 ml T_4 - ^{125}J -Standardlösung 1:5 verdünnt (s. 3.2.2.4) und 0,1 ml 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6) nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten angesaugt und anschließend die Säulen mit dem Natriumbarbitalpuffer umgepuffert. Dann wurden 1,5 ml gepooltes 1:90 verdünntes Schwangerenserum* auf die Säulen gepumpt und das Eluat gesammelt. Der auf der Säule verbliebene freie Anteil wurde mit 1 ml unverdünntem Kontrollserum eluiert.

3.2.3.2. Ergebnisse

3.2.3.2.1. Standardeichkurve in Puffer

Die Kurve (Δ — Δ) in Abbildung 4 zeigt eine typische Eichkurve, wie sie mit diesem System gewonnen wurde. Diese Standardkurve ist in dem Bereich von 0 - 20 ng T_4 -J ausreichend steil, so daß bei Einsatz von 0,1 ml Patientenserum der entsprechende Meßbereich des $PB^{127}I$ von 0 - 20 $\mu g/100$ ml erreicht wird.

*Die optimale Verdünnung des Schwangerenserums wurde bei Verwendung einer neuen "Charge" jeweils neu getestet. Sie schwankte zwischen 1:75 und 1:90.

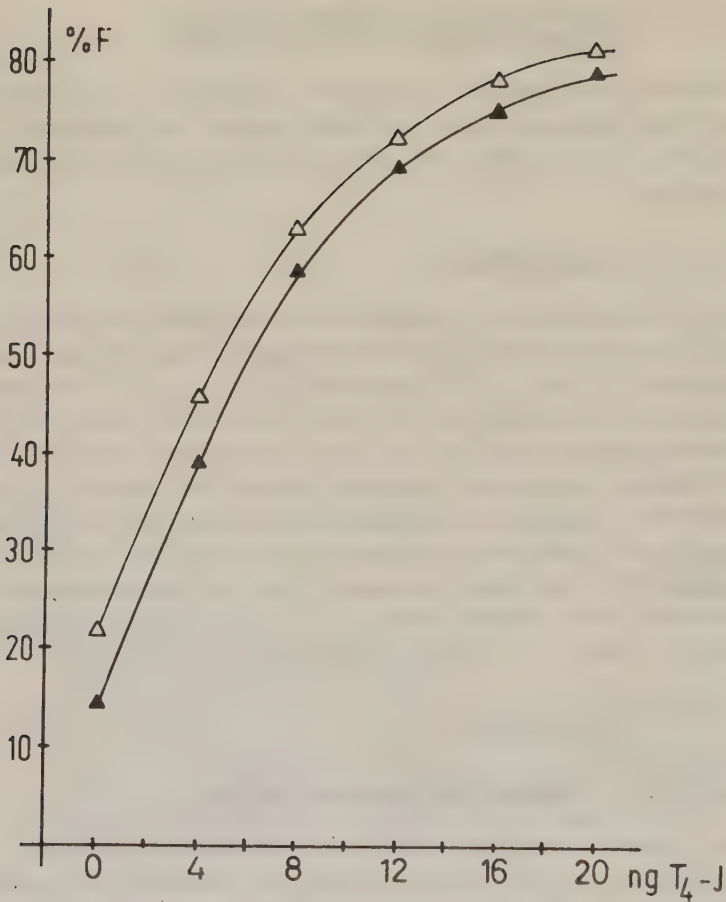


Abb.4: T₄-Standardeichkurven mit und ohne Zusatz von Nullserum zum Inkubationsgemisch

In der Abbildung sind die Eichkurven von 0 - 20 ng T₄-J dargestellt. Einmal wurde zum Inkubationsgemisch 0,1 ml Natriumbarbitalpuffer (0,05 M, pH 8,6) gegeben (Δ—Δ), zum anderen Mal wurde der Puffer durch 0,1 ml schilddrüsenhormonfreies Serum ersetzt (▲—▲).

3.2.3.2.2. Standardeichkurve in Nullserum

Werden die kalten T_4 -Standards in schilddrüsenhormonfreiem Serum anstatt in Pufferlösung (s. 3.2.3.1.) inkubiert und chromatographiert, so findet sich, wie Abbildung 4 zeigt, eine Parallelverschiebung der Eichkurve. Es werden gegenüber der Eichkurve in Puffer niedrigere Werte gemessen. So ergab ein gepooltes Kontrollserum ($PB^{127}I$, $4,4 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) an der Standardeichkurve in Puffer den Wert von $3,0 \mu\text{g } T_4\text{-J}/100 \text{ ml}$ und an der Kurve mit Nullserum dagegen den Wert von $4,2 \mu\text{g } T_4\text{-J}/100 \text{ ml}$ (s. Abbildung 4). Analog dazu fanden sich bei einer Verdünnungsreihe von einem Serum eines hyperthyreoten Patienten bis 1:16 zunehmend falsch hohe T_4 -Spiegel (s. Abbildung 5), da mit der Verdünnung des Serums auch die TBG-Bindungsvalenzen vermindert werden.

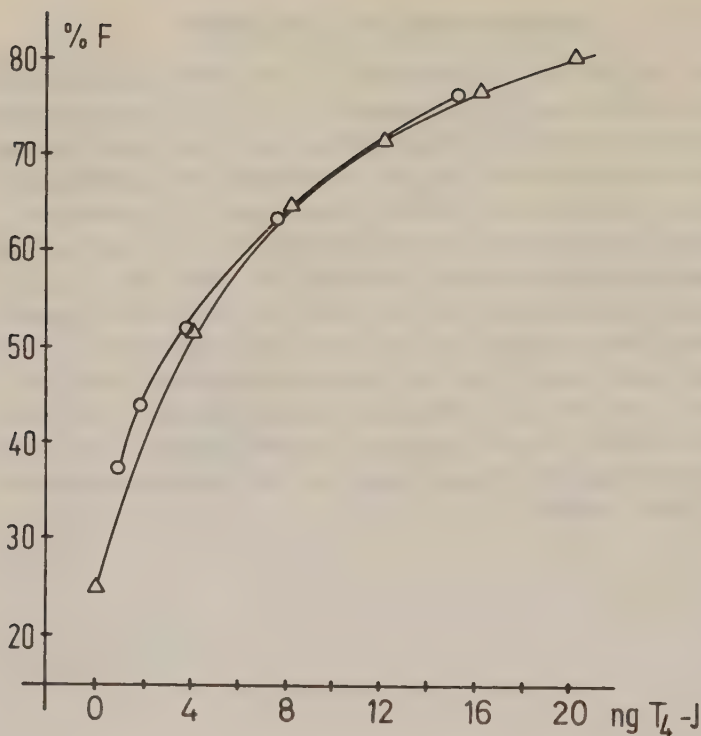


Abb.5: T₄-Standardeichkurve mit Nullserum und
Verdünnungskurve eines hyperthyreoten Serums

Die Abbildung zeigt einmal eine Eichkurve bei Zugabe von 0,1 ml Nullserum zum Inkubationsgemisch (Δ—Δ). Zum anderen Mal wurde das Serum eines hyperthyreoten Patienten gemessen und an der Eichkurve abgelesen. Die gefundenen %F-Raten der Proben mit dem 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünnten Serum wurden bei den entsprechenden Verdünnungswerten in das Koordinatensystem eingezeichnet (○—○).

3.2.3.2.3. Standardeichkurve in Albuminlösung

Auch durch Zusatz von 1 % Rinderalbumin zu den T_4 -Standardlösungen konnte keine vollständige Deckung der Eichkurven mit denen in schilddrüsenhormonfreiem Serum erreicht werden. Da also die erzielten Meßwerte für T_4 von der Konzentration der bindenden Proteine (TBG, TBPA, TBA) abhängen - wie sich auch an der Verdünnungskurve des hyperthyreoten Serums zeigt - ist vor der Säulenchromatographie eine Freisetzung des Schilddrüsenhormons aus der Proteinbindung erforderlich.

3.2.3.2.4. Standardeichkurve nach Alkalisierung des Inkubationsansatzes

Es ist bekannt, daß die Schilddrüsenhormon-Proteinbindung mit zunehmender Alkalisierung geringer wird (s. 3.2.1.3.). Nach Vorinkubation von 0,1 ml Serum und 0,2 ml 0,1 N Natrionlauge für 15 Minuten decken sich die Standardeichkurven in Albuminlösung und in Nullserum (s. Abbildung 8). Die Verdünnungsreihen von Hyperthyreosen-Seren liegen auf der Standardeichkurve.

3.2.3.3. Diskussion

Bei Chromatographie der Eichstandards in proteinfreiem Milieu, also nur Pufferlösung, wird T_4 jeweils relativ weit oben auf der Sephadexsäule an das Gel adsorbiert, so daß sich bei der CPBA das Gleichgewicht zwischen TBG und T_4 im oberen Abschnitt der Säule einstellt. Bei der weiteren Durchwanderung gibt das TBG dann wieder einen Teil des Hormons an das Gel ab (s. 3.2.2.5.1.). Dagegen muß bei der Bestimmung des Serum- T_4 -Gehalts erst die Proteinhormonbindung gelöst werden, wodurch das Thyroxin weiter unten auf der Säule adsorbiert wird, da für die Hormonextraktion aus

nicht vorbehandeltem Serum 1 g alkalisiertes Sephadex G-25 gerade ausreicht (s. 3.2.1.3.2.). Durch die Adsorption des Thyroxins in den tieferen Abschnitten der Säule muß hier die TBG-Lösung nach Äquilibrierung mit T_4 nurmehr ein geringeres Gelvolumen durchlaufen und gibt deswegen auch weniger Hormon wieder an das Gel ab. Die %F-Raten im proteinfreien Milieu sind also gegenüber den Serumwerten bei gleichem T_4 -Gehalt nach oben hin parallel verschoben (s. Abbildung 4).

Bei vorheriger Alkalisierung der Serumproben findet sich dagegen diese Parallelverschiebung der entsprechenden Eichkurven nicht mehr, d.h. die Serumproteinbindung des T_4 wird also im alkalischen Milieu ausreichend gelöst.

3.3. Automatisation und Ergebnisse

3.3.1. Automatisation

Zum routinemäßigen Einsatz der beschriebenen Methode wurden nun die einzelnen Schritte folgendermaßen automatisiert (25,32):

3.3.1.1. Automatisation der Inkubation

Die in Rinderalbumin aufbewahrte Lösung des radioaktiven T_4 (s. 3.1.1.) wird vor dem Versuch 1:1 mit 0,1 N Natronlauge verdünnt. Mit Hilfe eines Pipettierautomaten (Fisons-Pipettier-Verdünnungsautomat, Fa. IMA GmbH, Gießen) werden 0,1 ml Serum oder Eichstandard mit 0,3 ml dieses radioaktiven T_4 -Standards in ein Eppendorfreaktionsgefäß ohne Verschlusskappe gegeben und 15 Minuten stehen gelassen. Die Durchmischung des Ansatzes durch den Pipettierschritt ist völlig ausreichend, ein weiteres Schütteln auf einem Rotationsmischer ist nicht erforderlich.

3.3.1.2. Parallele simultane Säulenchromatographie

3.3.1.2.1. Geräteaufbau

Abbildung 6 a. und b. zeigt schematisch Längsschnitt und Aufsicht durch die Apparatur der Simultansäulenchromatographie, wie sie auch für den T_3 -in vitro-Test verwendet wird (34).

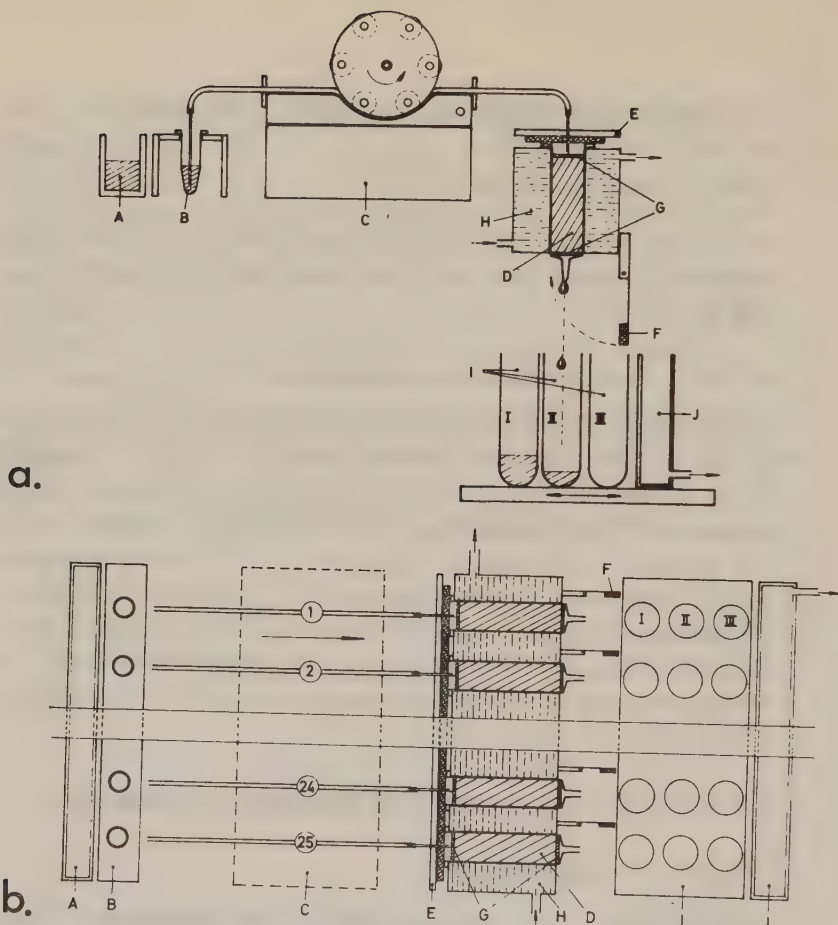


Abb. 6: Längsschnitt und Aufsicht der
Apparatur zur T_4 -Bestimmung

Die Abbildung zeigt schematisch Längsschnitt (a) und Aufsicht (b) der Apparatur für die simultane Säulenchromatographie zur Bestimmung des Serum- T_4 Gehaltes durch competitive Proteinbindungsanalyse.

- A = Vorratsgefäß für Puffer bzw. NaOH
- B = Gefäß für Inkubationsgemisch bzw. TBG-reiches Serum bzw. Nachwaschserum
- C = Proportionierungspumpe
- D = Dextrangelsäule
- E = Zentralverschluß (Zulauf)
- F = Zentralverschluß (Auslauf)
- G = Filtrierpapier
- H = Thermoblock
- I = Fraktionsröhrchen
- J = Abflußrinne

Mit einer 25-Kanal-Peristaltikpumpe (25-canal-micropump, Fa. Ismatec, Zürich) werden nacheinander Inkubationsgemisch, TBG-Lösung und Nachwaschserum aus den Eppendorfgläsern, bzw. Barbitalpuffer und Natronlauge aus dem Vorratsgefäß angesaugt und auf 25 Sephadexsäulen (s. 3.1.2.) im Thermoblock ($t = 28^{\circ}\text{C}$) gepumpt. Die Eluate der Säulen werden in die Abflußrinne verworfen oder aber in den Plastikröhrchen (I und II) gesammelt. Inkubationsgefäße und Fraktionssammelröhrchen bestehen aus Plastikmaterial und werden nach einmaliger Benutzung weggeworfen. Durch die parallele Anordnung von 25 Säulen, Inkubationsgefäßen und Auffangröhrchen ist es möglich, 25 Proben bei einem Durchgang zu bestimmen (s. Abbildung 6).

3.3.1.2.2. Durchführung

In Abbildung 7 ist der Ablauf der Chromatographie des T_4 -Nachweises dargestellt.

Die Sephadexsäulen sind mit 0,05 N Natronlauge äquilibriert. Nach quantitativem Ansaugen von 0,4 ml Inkubationsgemisch werden die Säulen mit 0,05 M Barbitalpuffer pH 8,6 in 20 Minuten umgepuffert. Die dabei eluierten Serumproteine und Tracerverunreinigungen werden verworfen. Jetzt kann die competitive Proteinbindungsanalyse auf den gleichen Säulen erfolgen. Hierzu werden jeweils 1,5 ml (mit einem Pipettierautomat abgefüllt) eines 1:90 verdünnten, gepoolten Schwangerenserums quantitativ aus den 25 Eppendorfgläsern abgesaugt. Bei anschließender Elution mit Barbitalpuffer wird das TBG-gebundene Thyroxin zeitgesteuert in dem Röhrchen I aufgefangen. Der freie Anteil wird mit 1 ml Nachwaschserum in einem zweiten Peak eluiert und in dem Röhrchen II gesammelt. Im Anschluß daran werden die Säulen bereits wieder mit Natronlauge alkalisiert, so daß sie für den nächsten Durchgang vorbereitet sind. Während der

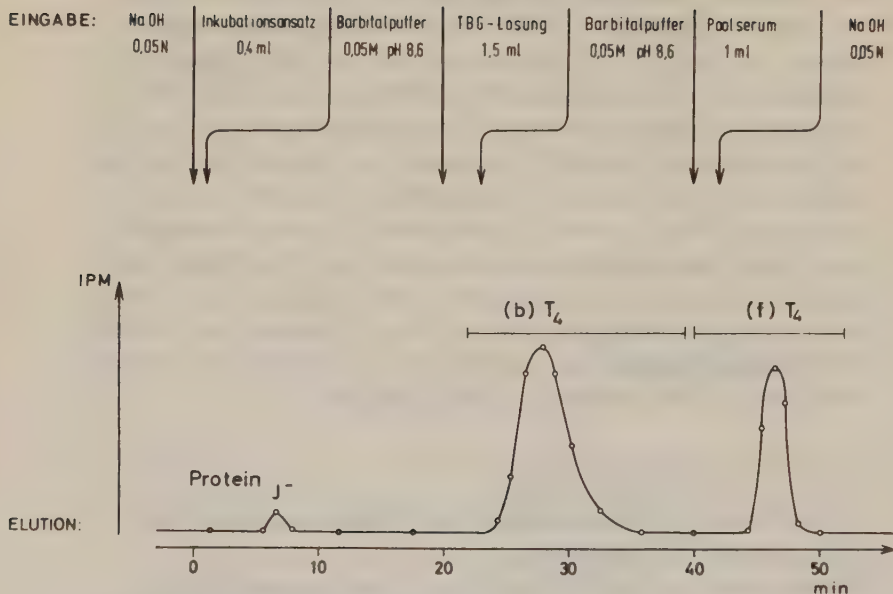


Abb.7: Eingabe und Elution der automatischen T_4 -CPBA-Bestimmung

Abgebildet sind Eingabe und Elution bei der Apparat zur automatischen Bestimmung des Serum- T_4 -Gehaltes durch competitive Protein-bindungsanalyse (Erklärung s. Text).

ganzen Bestimmung wird die Eingabe und das Sammeln der Eluate durch Uhren gesteuert. Die Sammelröhrchen können sofort im Anschluß an die Chromatographie am automatischen Gammameßplatz (Gamma-Guard, Fa. Tracerlab, Köln) gezählt werden.

3.3.1.2.3. Berechnung

Der freie Anteil errechnet sich aus dem prozentualen Verhältnis der Aktivität des Röhrchens II gegen die T_4 -Gesamtaktivität (d.h. Radioaktivität Röhrchen I + II).

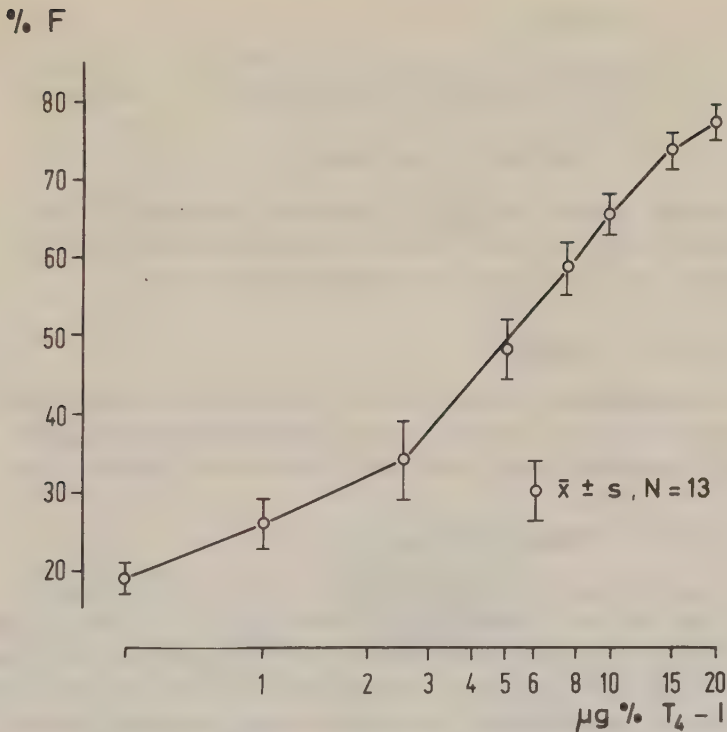


Abb.8: Standardeichkurve für T₄-¹²⁷J im Serum

Die Abbildung zeigt Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen ($\pm s$) von 13 an verschiedenen Tagen gewonnenen Eichkurven.

Bei semilogarithmischem Auftragen des Thyroxingehaltes gegen %F ist die Eichkurve für den Bereich von 2,5 - 15 µg Thyroxin-Jod/100 ml linear (s. Abbildung 8).

3.3.2. Ergebnisse

3.3.2.1. Statistische Qualitätskontrolle

3.3.2.1.1. Präzision in der Serie

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Präzision in der Serie war mit einem Variationskoeffizienten von 3,4 % sehr zufriedenstellend (10).

3.3.2.1.2. Kapazität

Die Kapazität der Methode von 25 Proben in 45 Minuten ermöglicht zwischen 50 und 100 Doppelbestimmungen täglich, was bequem von einer Arbeitskraft bewältigt werden kann.

3.3.2.1.3. Normalbereich

Der logarithmisch verteilte Normalbereich lag zwischen 3,1 und 6,6 $\mu\text{g T}_4\text{-J}/100\text{ ml}$ (s. Abbildung 9) und deckt sich so einerseits genau mit unserem PB ^{127}I Normalbereich von 3,1 - 6,8 $\mu\text{g T}_4\text{-J}/100\text{ ml}$, andererseits auch mit den in der Literatur beschriebenen Normalbereichen, die mit anderen T_4 -CPBA-Techniken erhalten wurden (6,9,69).

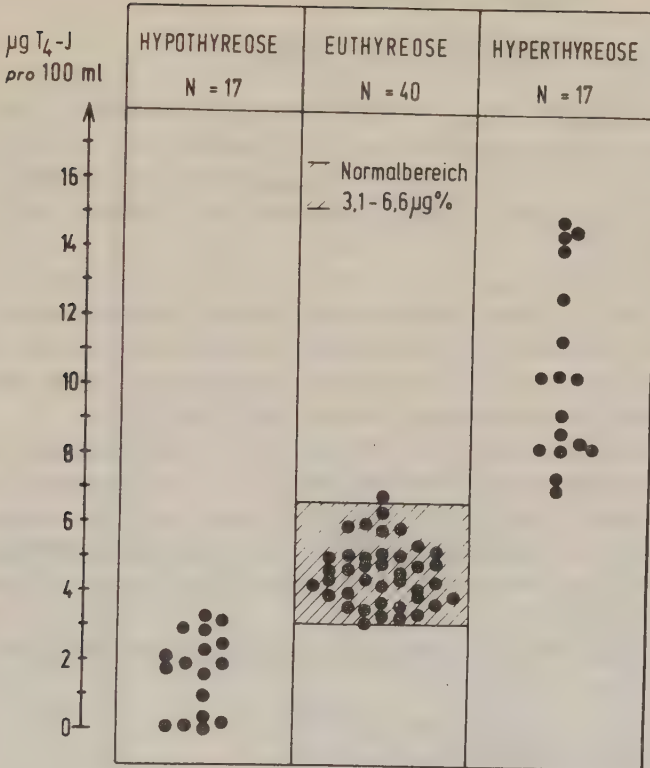


Abb.9: Normalbereich und Kollektiv
von Hypo- und Hyperthyreosen

Aufgezeichnet sind die T₄-J-Spiegel von 40 euthyreoten Personen und der aus den Werten errechnete Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$). Ferner sind die Serumwerte von 17 klinisch diagnostizierten Hypothyreosen und 17 Hyperthyreosen abgebildet.

3.3.2.2. Klinische Ergebnisse

3.3.2.2.1. Diagnostische Wertigkeit

Wie Abbildung 9 zeigt, konnte eine gute Abtrennung der Hyper- und Hypothyreosen von dem Normalkollektiv erzielt werden. Da hierbei auch einige besonders markante Hypothyreosen bestimmt wurden, liegen manche Meßwerte bei $0 \mu\text{g}\%T_4\text{-J.}$

Hohe Thyroxinspiegel trotz normaler Schilddrüsenfunktion findet man mit der beschriebenen Methode ebenso wie mit anderen Verfahren bei erhöhtem TBG-Gehalt des Serums, welcher durch Gravidität, Östrogen- und Antiovalantien-Behandlung oder auch genetisch bedingt sein kann (23).

Umgekehrt findet man erniedrigte Werte ohne Hypothyreose bei Verminderung der TBG-Spiegel so z.B. bei Dysproteinämien. Diese TBG-Dysproteinämien lassen sich aber durch den ebenfalls automatisierten T_3 -in vitro-Test erkennen und somit von echten Hypo- und Hyperthyreosen unterscheiden (30,34,64,65,67).

Auch einige Pharmaka können den Thyroxingehalt des Serums beeinflussen (46,52,73).

3.3.2.2.2. Spezifität

Zur Frage der Spezifität wurden bei euthyreoten Patienten direkt vor und nach einer intravenösen Biligrafin-Injektion bzw. einer intravenösen Urografen-Infusion die T_4 -Spiegel im Serum bestimmt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 10 aufgezeichnet.

Nach Biligrafin-Injektion stieg der Thyroxingehalt regelmäßig geringfügig an und sank auch während der nächsten Tage kaum ab. Diese Zunahme dürfte als die bekannte Hämokonzentration beim Liegen zu interpretieren sein, denn die Blutentnahme vor der Biligrafin-Injektion erfolgte am bett-

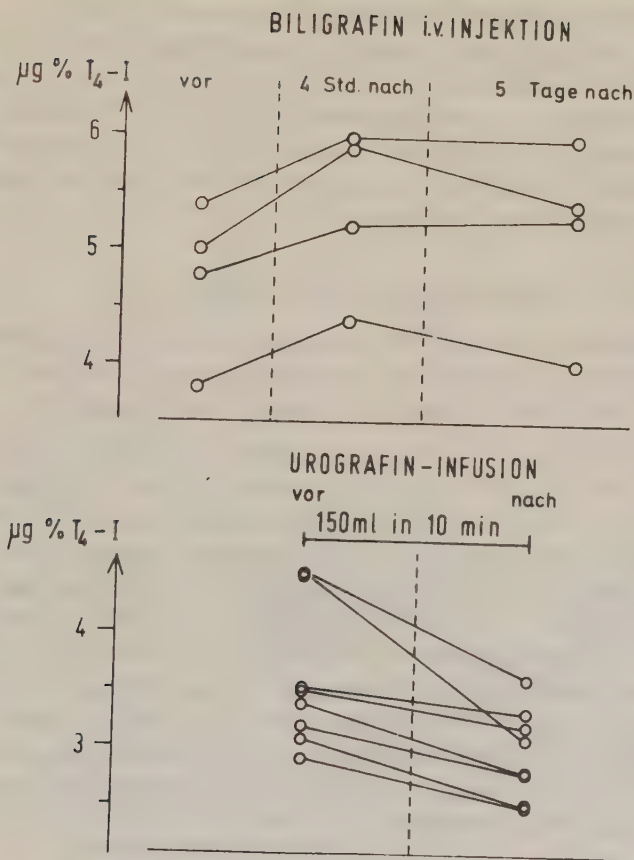


Abb.10: Verlaufskurven der Thyroxinspiegel nach Biligrafininjektion und Urografeninfusion

Die Abbildung zeigt die Verlaufskurven von 4 Patienten vor bzw. 4 Stunden bzw. 5 Tage nach Biligrafininjektion, sowie die Verlaufskurven von 8 Patienten direkt vor bzw. nach Urografeninfusion.

längerigen Patienten, während die Werte für 4 Stunden und 5 Tage nach Biligrafin ambulant abgenommen wurden. Mit Urografin dagegen nahmen die direkt vor der Infusion gemessenen T_4 -Spiegel unter der Infusion um etwa 20 % ab. Hierbei handelt es sich offensichtlich um die bekannte Hämodilution bei schneller Applikation hyperosmolarer Kontrastmittellösungen. Eine Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion lag sicher nicht vor.

3.3.2.2.3. Vergleich von T_4 -CPBA und PB ^{127}I

Der Vergleich von PB ^{127}I - und T_4 -Werten bei unausgesuchten Gruppen von Patienten mit Hyperthyreose, blander Struma und Hypothyreose ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die erste Spalte (~) enthält jeweils die Fälle, deren PB ^{127}I - und T_4 -Werte übereinstimmten, in der dritten Spalte (V) sind die offensichtlich jodverseuchten Seren eingetragen, die im PB ^{127}I weit außerhalb des Meßbereiches lagen. Die mittlere Kolonne (Δ > 2) zeigt die mäßig verseuchten PB ^{127}I -Werte, also maskierte Jodverseuchungen, die in der Diagnostik besonders gefürchtet sind, da die Beurteilung der Schilddrüsenfunktion allein auf Grund des gemessenen PB ^{127}I -Wertes leicht zu Fehlschlüssen führen kann. Die den verseuchten PB ^{127}I -Werten entsprechenden T_4 -Werte liegen im erwarteten Bereich und erlauben die richtige Diagnose.

PB¹²⁷I (○) und T₄-JOD (●) : EINZELWERTE IM VERGLEICH

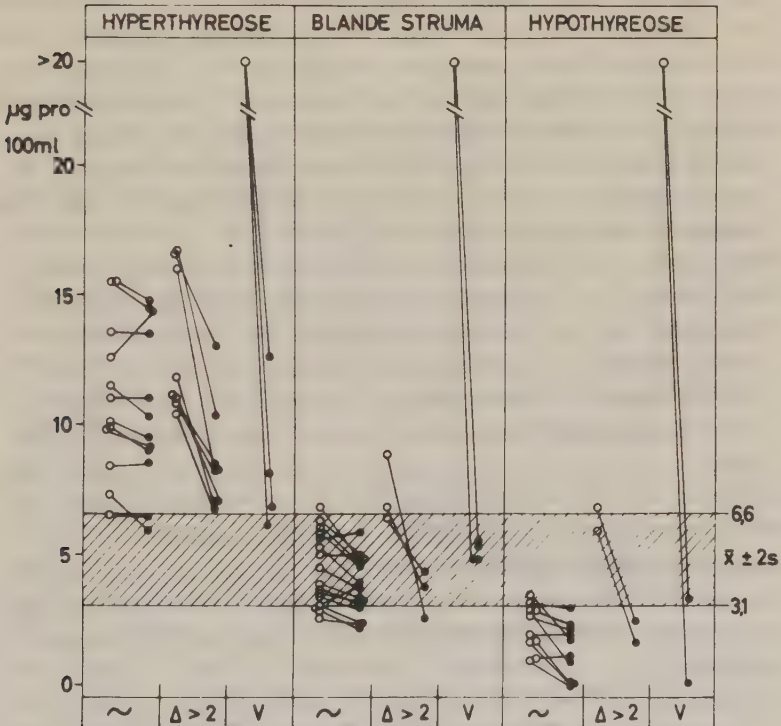


Abb.11: Gegenüberstellung der Meßwerte mit der CPBA und dem PB¹²⁷I

In der Abbildung sind die Meßwerte von Patienten mit Hyperthyreose, blander Struma und Hypothyreose sowohl mit der CPBA, als auch mit dem PB¹²⁷I aufgezeichnet. Die schraffierte Fläche stellt den Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) dar. Die einzelnen Serumwerte wurden in nichtverseuchte, mäßig verseuchte und stark verseuchte Werte unterteilt (Erklärung s. Text).

3.4. Diskussion

Die beschriebene Methode ermöglicht durch Hormonextraktion und Nachweis auf einer Säule eine schnelle, automatisierte und wirtschaftlich günstige Bestimmung des Serumthyroxins. Da es sich hierbei um ein geschlossenes, temperaturkonstantes System handelt, kann eine gute Standardisierung erreicht werden. Nach Berechnung des Index des freien Thyroxins durch Multiplikation des T_4 -Wertes mit dem prozentualen Anteil des freien T_3 beim T_3 -in vitro-Test (7,12,57), der nach dem gleichen Prinzip automatisiert ist, hatten die untersuchten Hyperthyreosen und Hypothyreosen zu über 95 % erhöhte bzw. erniedrigte Indexwerte. Auch Seren mit Dysproteinämien (s. 3.3.2.2.1.) lassen durch Berechnung dieses Indexwertes die wahre Schilddrüsenfunktionslage erkennen. Besonders wegen der Gefahr maskiert-jodverseuchter Seren sind wir darauf aus, unseren PB ^{127}I -Autoanalyzer durch die competitive Proteinbindungsanalyse des Thyroxins zu ersetzen. Durch die Möglichkeit, den Thyroxingehalt in nur 0,1 ml Serum quantitativ zu bestimmen, eignet sich diese Methode besonders auch in der Kinderklinik oder bei Tierexperimenten.

4. TRIJODTHYRONINBESTIMMUNG DURCH COMPETITIVE PROTEINBINDUNGSANALYSE

4.1. Einleitung

T_4 liegt im Serum in ca. 40fach höherer Konzentration als T_3 vor. Eine direkte Messung der T_3 -Spiegel im Serum oder in Serumextrakten ohne vorherige T_3 - T_4 -Trennung ist mit den üblichen Verfahren (chemisch, CPBA) zur Zeit daher nicht möglich. Auch die bisher publizierten radioimmunologischen Methoden zur T_3 -Bestimmung wurden vielfach wegen nicht ausreichender Spezifität kritisiert - Fehlerquellen sind hier einmal unzureichende Freisetzung des T_3 aus der Serumproteinbindung, zum anderen eine Cross-Reaktion der T_3 -Antikörper mit T_4 , die bei dem erheblichen physiologischen Überschuß von T_4 im Serum eine wesentliche Rolle spielt.

Die Schwierigkeiten bei der T_3 -Bestimmung im Serum lassen sich besonders aus den z.Z. erheblich divergierenden Normalbereichen der verschiedenen Untersuchungsgruppen ablesen (5,19,21,29,35,70).

Unser Vorhaben war es nun, nach ausreichender säulenchromatographischer Trennung (4,26,60,61) von T_3 und T_4 einen empfindlichen und spezifischen Nachweis für T_3 mit der CPBA zu entwickeln (T_3 -Antikörper standen uns nicht zur Verfügung).

4.2. Reagenzien und Säulenpräparation

4.2.1. Reagenzien

Radioaktive Hormone T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J s. 3.1.1.

Nachgereinigte T_3 - ^{125}J -Standardlösung: Die T_3 - ^{125}J -Standardlösung wurde jeweils über eine 3 g Sephadex G-25 superfine-Säule (s. 4.3.2.) chromatographiert und der Gipfel der Radioaktivität in einer Fraktion gesammelt.

Die stabilen Hormone 3, 3', 5-Trijod L-Thyronin, purissimum und L-Thyroxin, purum (Fa. Fluka AG., Buchs) wurden in einem kleinen Volumen 1 N NaOH gelöst und mit Wasser weiter verdünnt, so daß die Endverdünnungen (0 - 5 $\mu g/100$ ml T_3 -J bzw. T_4 -J) in 0,005 N NaOH vorlagen.

4.2.2. Verwendete Ionenaustauscher

Die Kationenaustauscher AG 50 W-X 4 minus 400 mesh, hydrogen form, AG 50 W-X 2, 200 - 400 mesh, hydrogen form, Bio-Rex 70, 50 - 100 mesh, sodium form (Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.), Dowex 50 W-X 4, 200 - 400 mesh, Amberlite IR-112 (Fa. Serva, Heidelberg) und SP-Sephadex C-25 (Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden) wurden mehrmals in 0,5 N und dann in 0,1 N Salzsäure ausgeschüttelt, der Anionenaustauscher Amberlite IRA-93 (Fa. Serva, Heidelberg) mit 0,5 N Natronlauge (17).

4.2.3. Verwendete Gele

Die Dextrangele Sephadex G-15, G-25 coarse, fine und superfine, G-50 superfine und fine und LH-20 (Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden) sowie die Polyacrylamidgele Biogel P-2, P-10, P-30 jeweils 100 - 200 mesh (Fa. Bio-Rad La-

boratories, Richmond, Calif.) wurden über Nacht in Aqua bidest. gequollen.

4.2.4. Säulenpräparation

Als Säulen wurden jeweils 2 ml (Fa. Amefa, Dänemark), 5 ml (Fa. Braun, Melsungen) oder 10 ml (Fa. Terumo, Japan) - Einmalspritzen verwendet (Präparation s. 3.1.2.).

4.3. Methodische Vorversuche

4.3.1. Hormonextraktion aus dem Serum

Zur quantitativen Extraktion von T_3 und T_4 aus 3 ml Serum erwies sich in Anlehnung an die Methode von RUHL (60) und BOROWZAK (4) eine Kationenaustauschersäule mit 5 ml SP-Sephadex C-25, H^+ -form als geeignet. Nach vollständigem Austausch der H^+ - gegen K^+ -Gegenionen durch Nachwaschen mit 1 N Kaliumacetat- und anschließend 1 N KCl-Lösung, konnte T_3 und T_4 in einem scharfen Peak mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 eluiert werden. Die Wiederfinderate lag über 95 % (Durchführung s. 4.4.1.).

4.3.2. Trennung von T_3 und T_4

Wie von RUHL (60) und BOROWZAK (4) gezeigt wurde, konnte im Eluat von der Kationenaustauschersäule (s. 4.3.1.) T_3 nach Chromatographie über eine 10 ml Sephadex G-25 superfine-Säule ausreichend von T_4 abgetrennt werden. Die beste Trennung mit einem freien Intervall von ca. 20 ml wurde mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 erzielt, die Wiederfinderate lag bei diesem Schritt um 95 % (s. Abbildung 12) (Durchführung s. 4.4.2.).

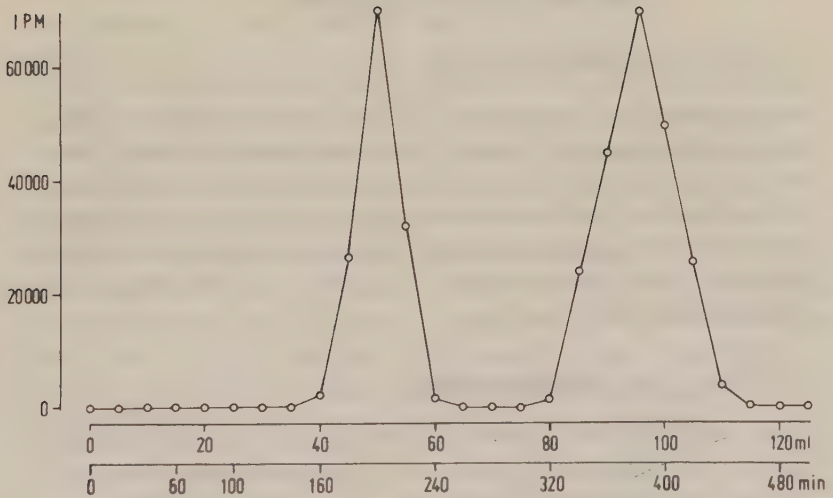


Abb.12: Elutionsdiagramm der chromatographischen Trennung von T_3 und T_4

Die Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm der chromatographischen radioaktiven Trennung von T_3 - ^{125}J und T_4 - ^{125}J auf 10 ml Sephadex G-25 superfine.

4.3.3. Konzentrierung des T_3 -Gipfels nach chromatographischer Trennung

4.3.3.1. Anionenaustauscher

Auf kleinen 2 ml-Säulen mit 0,5 ml der stark basischen Anionenaustauscher Amberlite IRA-93 oder IRA-401, jeweils in der Hydroxylform, wird T_3 aus dem alkalischen Lösungsmittel (Kaliumphosphatpuffer pH 11,3) vollständig adsorbiert. Allerdings kann T_3 nur mit konzentrierter Essigsäure oder Ameisensäure zu ca. 80 % wieder von den Austauschern eluiert werden.

4.3.3.2. Kationenaustauscher

Nach Ansäuern des Eluats der Trennsäule (s. 4.3.2.) z.B. mit 0,1 N HCl wird T_3 auch auf 1 ml-Säulchen mit dem stark sauren Kationenaustauscher AG50W-X4 oder AG50W-X2, Dowex W-X2, Bio-Rex 70 oder 2 ml SP-Sephadex C-25 (s. 4.2.2.) quantitativ adsorbiert. Nach Austausch der H^+ gegen K^+ -Ionen (s. 4.3.1.) kann T_3 wieder bei pH-Werten über pH 11 in einem scharfen Peak eluiert werden.

4.3.3.3. Dextrangele

Da die Adsorptionskapazität der Dextrangele für T_3 mit fallenden pH zunimmt (s. 4.3.4.2.3.), muß zur Konzentrierung von T_3 das alkalische Eluat der Trennsäule (s. 4.3.2.) mit Salzsäure angesäuert werden. Während es nicht möglich ist, den T_3 -Peak nach Ansäuerung auf 5 ml Sephadex G-50 superfine oder Biogel P-2 zu konzentrieren, da die Adsorptionskapazität dieser Gele nicht ausreicht, wird das Hormon auf 5 ml Sephadex G-25 superfine sehr stark verzögert. Diese Konzentrierkapazität ist neben dem pH-Wert auch abhängig vom Durchflußvolumen der Säule, so daß es

bei kontinuierlicher Ansäuerung besser ist, konzentrierte Salzsäure in geringerem Volumen zuzuspeisen, als niedriger normale in größerem Volumen.

Außerdem kann die Kapazität der Säule durch Kühlung auf ca. 10°C erhöht werden. Auf den höher vernetzten Dextrangelen Sephadex G-10 und G-15 wird T_3 wesentlich stärker als auf G-25 adsorbiert, kann dann allerdings auch nur in einem breiten Peak eluiert werden, wie schon für T_4 gezeigt wurde (s. 3.2.1.3.2.).

Auf einer 2 ml Sephadex LH-20-Säule dagegen wird T_3 schon im alkalischen Milieu deutlich verzögert; eine ausreichende Konzentrierung des breiten T_3 -Elutionspeaks von der Trennsäule (s. 4.3.2.) gelingt aber ebenfalls nur durch Ansäuern. Als Elutionsmittel eignen sich Methanol-Ammoniakgemische, reines Methanol und Amine, wie z.B. Dimethylamin.

4.3.4. Hormonnachweis

4.3.4.1. Inkubationsansatz

Zur Ermittlung einer Standardeckurve für T_3 wurden 0,2 ml T_3 - ^{127}J -Standardlösung (0 - 10 ng T_3 -J/200 μl) mit 0,2 ml radioaktiven T_3 -Standard (s. 3.1.1.) und 0,2 ml 1:5 verdünntem TBG-reichem Serum (s. 3.1.1.) für 15 Minuten inkubiert. Diese Zeit reicht zur Äquilibration vollständig aus.

4.3.4.2. Trennung B/F

Zur Trennung von proteingebundenem und freiem T_3 - ^{125}J wurde der Inkubationsansatz quantitativ über jeweils 5 ml-Dextran-gel- oder Polyacrylamid-Säulen, die vorher mit 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 äquilibriert wurden, mit Hilfe einer Peristaltikpumpe chromatographiert. Der proteingebundene Anteil wird im äußeren Gelvolumen unverzüglich eluiert, während der freie Anteil mehr oder weniger stark am Gel adsorbiert bleibt und durch einen Überschuß Nachwaschserum in einem schmalen Peak eluiert werden kann (s. 3.2.2.1.).

4.3.4.2.1. Dextrangele

Wie Abbildung 13 zeigt, konnten auf Sephadex G-50 superfine-Säulen die besten Eichkurven erzielt werden. An Hand des freien Anteils an T_3 - ^{125}J konnte nochmals die Zunahme der Bindungskapazität des Dextrangels für T_3 mit steigendem Vernetzungsgrad und Abnahme der Korngröße bestätigt werden.

4.3.4.2.2. Biogele

Während auf den Biogelen P-10 und P-30 keine ausreichende B/F-Trennung gelang, konnte durch Verwendung von Biogel P-2

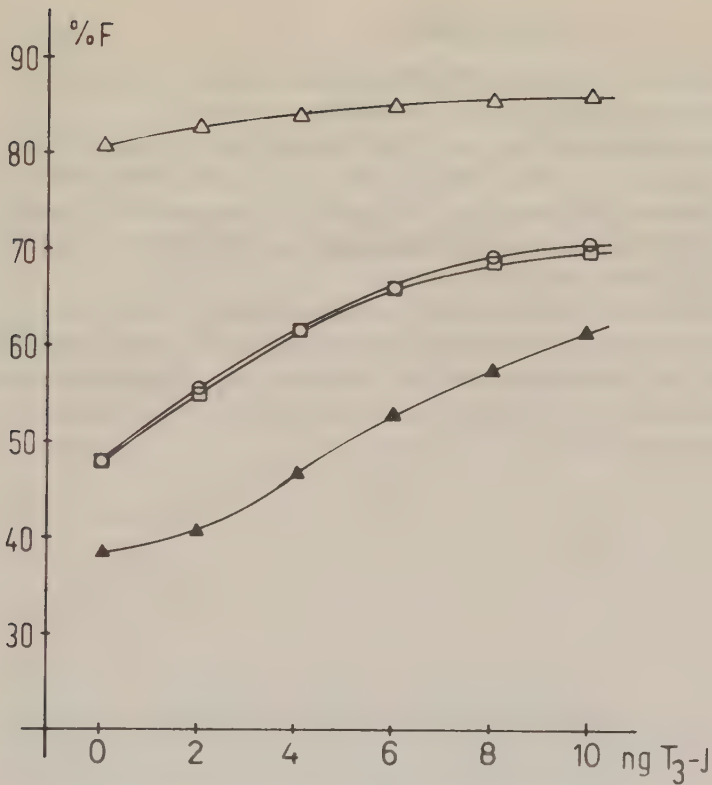


Abb.13: T_3 -Standardeichkurven bei Verwendung verschiedener Dextrangele

Aufgezeichnet sind die Eichpunkte von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 ng T_3 -J bei Verwendung zur B/F-Trennung von 5 ml Sephadex G-25 fine ($\triangle$ — $\triangle$), 5 ml Sephadex G-50 superfine ($\circ$ — $\circ$), 5 ml Sephadex G-50 fine ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) und 5 ml Biogel P-2 ($\square$ — $\square$).

eine steile Eichkurve bei ca. doppelt starker Verdünnung des TBG-reichen Serums gegenüber Sephadex G-50 superfine erzielt werden (s. Abbildung 13).

4.3.4.2.3. Pufferlösungen

Zur Frage der Empfindlichkeit der Standardeichkurven wurden verschiedene Pufferlösungen geprüft.

Bei Verwendung von 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,0 kommt es, wie Abbildung 14 zeigt, zu einer Nullpunktverschiebung (%F) von ca. 30 % auf 47 % gegenüber Tris-HCl-Puffer oder Natriumphosphatpuffer gleicher Molarität und gleichen pH-Werts.

Das erklärt sich aus der Verdrängung des T_3 aus der Bindung an TBA durch Barbital, wodurch T_3 dann praktisch nur noch spezifisch an TBG gebunden ist. Dadurch wird die Steilheit der Standardeichkurven wesentlich verbessert (s. 3.2.2.2.).

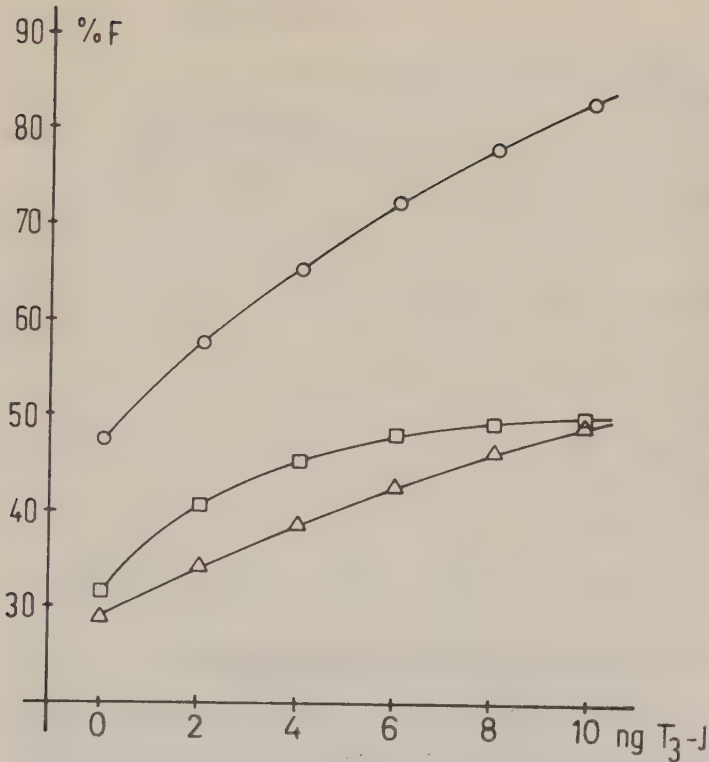


Abb.14: T₃-Standardeichkurven in Abhängigkeit von verschiedenen Pufferlösungen

Aufgezeichnet sind die Eichpunkte von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 ng T₃-J, wobei als Elutionsmittel 0,05 M Puffer pH 8,0 - Natriumphosphatpuffer (□—□), Tris-HCl-Puffer (△—△), Natriumbarbitalpuffer (○—○) - und als Gel 5 ml Sephadex G-50 superfine verwendet wurde.

Wird jetzt ein Barbitalpuffer mit einem pH-Wert von 8,6 anstatt pH 8,0 verwendet, so wird diese T₃-Standardeichkurve um ca. 10 %F nach unten verschoben (s. Abbildung 15),

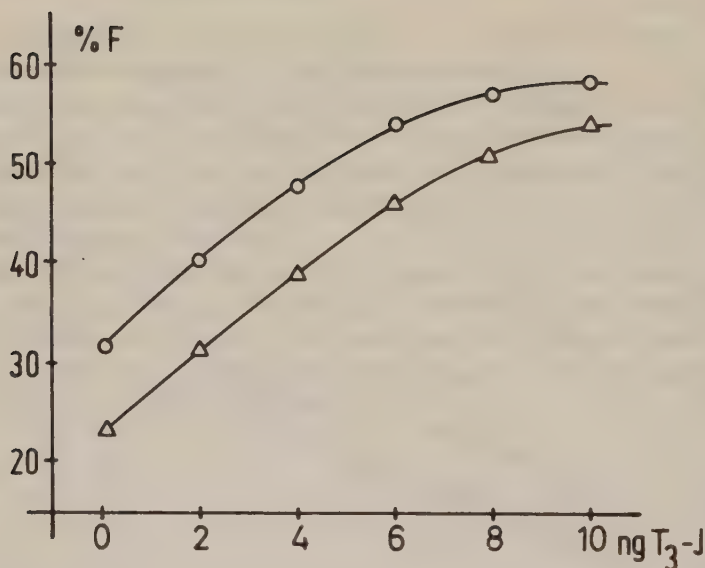


Abb.15. T₃-Standard Eichkurven in Abhängigkeit vom pH-Wert der Pufferlösungen

Aufgezeichnet sind die Standard Eichkurven von 0 - 10 ng T₃-J auf 5 ml Sephadex G-50 superfine bei Verwendung von 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,0 (○—○) und 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 (△—△).

denn zwar nimmt mit steigendem pH die Bindungskapazität des TBG für T₃ ab (s. 3.2.1.3.), aber noch stärker vermindert sich die Adsorptionskapazität des Dextrangels für T₃.

Die Verwendung von Barbitalpuffer pH 8,6 besitzt also den Vorteil, daß die Eichkurve einen günstigeren Nullpunkt besitzt, wodurch eine stärkere Verdünnung des TBG-Serums möglich ist.

4.3.4.2.4. TBG-Lösungen

Da Trijodthyronin schwächer an TBG gebunden wird als Thyroxin (62), wurden für die CPBA für T_3 nochmals verschiedene TBG-Lösungen erprobt (s. 3.2.2.3.). Getestet wurden hierbei Normalserum, Serum eines mit Thybon substituierten Patienten und verschiedene TBG-reiche Seren von Schwangeren* im 2. Trimenon, alle in der gleichen Verdünnung (s. Abbildung 16).

Abbildung 16 zeigt, daß das Serum eines mit Thybon vorbehandelten Patienten zwar besser geeignet war als das einer Normalperson; eine ausreichend steile Eichkurve für T_3 konnte jedoch, wie schon bei der T_4 -CPBA (s. 3.2.2.3.), nur bei Verwendung eines TBG-reichen Serums (Serum von Schwangeren oder östrogentherapierten Patientinnen) erzielt werden. Allerdings gibt es auch hier besonders gut und weniger geeignete Seren.

Die chromatographische Vorreinigung der Seren über eine Sephadex G-10-Säule zur Entfernung des endogenen Schilddrüsenhormons brachte auch hier keine weitere Verbesserung (s. 3.2.2.3.)

Wünschenswert wäre eine Verwendung von reinem TBG statt Serum von Schwangeren, jedoch ist die Herstellung dieser Proteinfraction leider sehr aufwendig. Vielleicht läßt sich dieses Problem durch das Verfahren der Adsorptionschromatographie lösen.

*An dieser Stelle bedanken wir uns bei Herrn Priv.Do. Dr.med. Dr.rer.nat. E.KUSS, I. Frauenklinik der Universität München, für die Bereitstellung der Seren schwangerer Frauen.

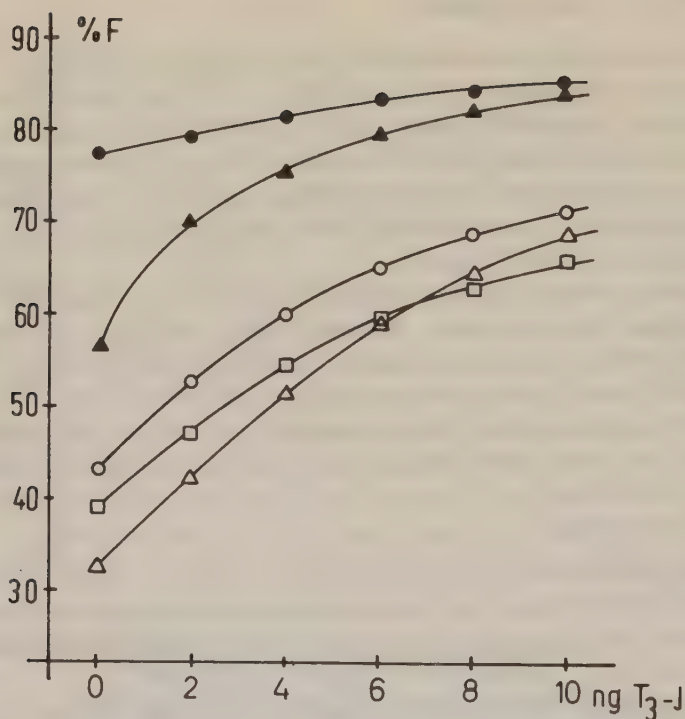


Abb. 16: T₃-Standardeichkurven mit verschiedenen TBG-Lösungen

Aufgezeichnet sind die Standardeichkurven von 0 - 10 ng T₃-J auf 5 ml Sephadex G-50 superfine mit 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 bei Verwendung von Normalserum (●—●), Serum eines mit Thyron behandelten Patienten (▲—▲) und 3 verschiedenen Seren von Schwangeren (TBG-reiche Seren) (○—○, □—□, △—△), alle Seren in gleicher Verdünnung.

4.3.4.2.5. Temperaturabhängigkeit

Bei der Trennung des TBG-gebundenen (B) und des freien T_3 - ^{125}J (F) spielt neben der Menge des Dextrangels auch die Temperatur eine entscheidende Rolle. Wie schon von ZACH gezeigt werden konnte (76), nimmt mit steigender Temperatur die Dissoziation der Schilddrüsenhormon-TBG-Bindung und damit die Bindung des T_3 und T_4 an Dextrangel zu. Es wurde deshalb immer temperaturkonstant, aus technischen Gründen in Nähe der Zimmertemperatur bei $26^{\circ}C$ gearbeitet.

4.3.4.3. Berechnung

Berechnet wurde grundsätzlich der Dextrangel-gebundene Anteil des T_3 - ^{125}J in % der Gesamtaktivität (%F).

4.3.5. Konzentrierschritt mit nachfolgender T_3 -CPBA

4.3.5.1. T_3 -CPBA direkt auf der Konzentriersäule

Da bei der T_4 -Bestimmung im Serum die Verbindung von Extraktion aus dem Serum und damit Konzentration des T_4 auf einer Säule und anschließender kompetitiven Proteinbindungsanalyse auf der gleichen Säule möglich war (s. 3.2.3.), wurde auch für den T_3 -Nachweis versucht, die CPBA gleich auf der Konzentriersäule durchzuführen.

Auf Anionen- und Kationenaustauschern, sowie Sephadex LH-20 bleibt das T_3 so fest gebunden, daß es sich sogar mit unverdünntem Serum nur zum kleinen Teil eluieren läßt. Eine Ausnahme macht der Kationenaustauscher SP-Sephadex C-25, auf dem mit verdünnter TBG-Lösung eine allerdings nicht ausreichend empfindliche Eichkurve erstellt werden konnte.

Auf einer 5 ml Sephadex G-25 superfine-Säule ließ sich T_3 nach dem Trennschritt quantitativ adsorbieren (s. 4.3.3.3.). Nach Umpuffern mit 0,05 M Barbitallpuffer pH 8,6 konnte zwar bei der CPBA eine Eichkurve erhalten werden, allerdings streuten die Doppelwerte erheblich. Der Grund hierfür liegt sicherlich in der nicht ausreichenden Standardisierung der Verteilung des T_3 über die Dextrangsäule nach dem Konzentrierschritt.

Abbildung 17 zeigt das am Beispiel extrem unterschiedlicher Verteilungen:

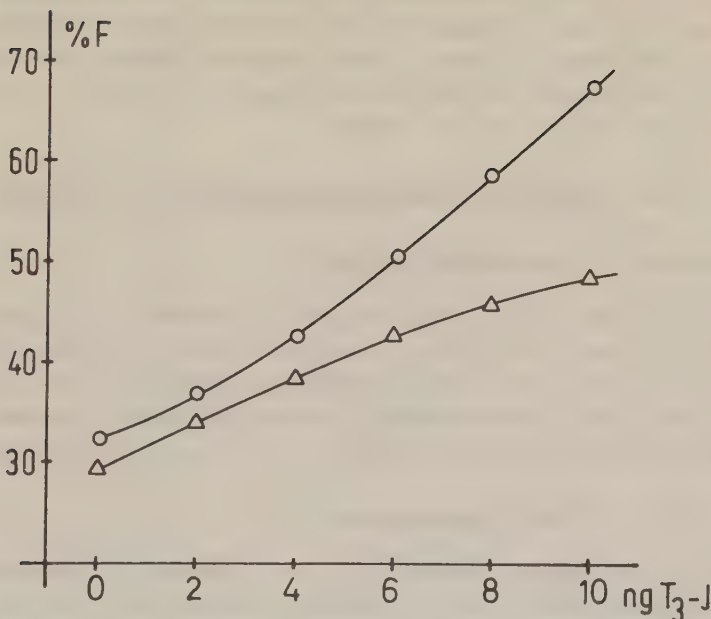


Abb.17: T₃-Standardeichkurven bei verschiedener
Verteilung des T₃ auf der Säule

Die Abbildung zeigt den unterschiedlichen Verlauf von 2 Standardeichkurven von 0 - 10 ng T₃-J, wenn radioaktives und kaltes T₃ einmal in einem kleinen Volumen (O—O), beim anderen Mal in einem großen Volumen (Δ—Δ) auf die Säule aufgetragen wird (Methodik s. Text).

Bei Kurve (O—O) wurde das Gemisch aus radioaktivem und kaltem T₃ in einem schmalen Peak von 0,6 ml auf die Dex-trangelsäule aufgetragen, während die Kurve (Δ—Δ) nach Konzentrierung des T₃-Peaks von der Trennsäule gewonnen wurde. Wegen der kompetitiven Bindung des T₃ durch TBG und Dextrangel können daher reproduzierbare Eichkurven

nur bei einem standardisierten Auftragen des Gemisches von kaltem und radioaktivem T_3 in einem möglichst scharfen Peak erzielt werden. Diese Voraussetzungen sind jedoch für die competitive Proteinbindungsanalyse direkt auf der Konzentrationsäule nicht gegeben.

4.3.5.2. Elution von der Konzentrationsäule mit Einengen

4.3.5.2.1. Anionenaustauscher

Auf kleinen 0,5 ml Anionenaustauschersäulen (s. 4.3.3.1.) wird T_3 zwar quantitativ adsorbiert, kann hier jedoch nur mit konzentrierter Essigsäure oder Ameisensäure eluiert werden. Nach vollständigem Eindampfen liegen die sehr schwankenden Wiederfinderraten jedoch jeweils unter 50 %.

4.3.5.2.2. Kationenaustauscher

Mit einer Ammoniaklösung, die ohne Rückstände eindampfbar ist, ließ sich T_3 von Kationenaustauschersäulen (s. 4.3.3.2.) eluieren. Dazu wurden die Bio-Rex 70-Säulchen nach dem Konzentrationsschritt zunächst mit 3 ml 1 N HCl, dann 5 ml Aqua bidest. gespült; das T_3 konnte dann mit 5 ml 5 N Ammoniaklösung in einem scharfen Peak eluiert werden. Nach Einengen im geschlossenen System unter nachgereinigtem Stickstoff bei 80°C im Wasserbad, konnte eine Wiederfinderrate von 95 % erzielt werden. Der Rückstand an T_3 wurde mit 0,6 ml TBG-reichem Serum (Verdünnung 1:27) aufgenommen und nach 15 Minuten Inkubationszeit im Schüttelbad über eine 5 ml Sephadex G-50 superfine zur Trennung von B/F (s. 4.3.4.2.1.) gegeben (Abbildung 18 Kurve □—□). Zur Überprüfung der während dieser Prozedur auftretenden Blancs wurden jeweils Kontrollproben (0,2 ml Standardlösung, 0,2 ml T_3 - ^{125}J , 0,2 ml TBG-Serum 1:9 verdünnt) ohne vorherigen Einengenschritt mitgetestet (Kurve ○—○).

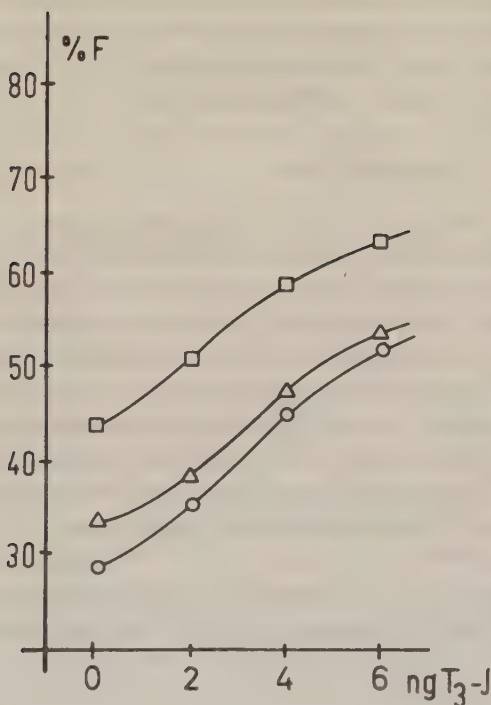


Abb.18: T₃-Standard Eichkurven nach Einengen
der Eluate von den Konzentriersäulen

In der Abbildung sind die Standard Eichkurven von 0 - 6 ng T₃-J ohne Einengschritt (○—○), bei Zugabe des radioaktiven T₃-¹²⁵J nach dem Einengschritt (△—△) und bei Einengung sowohl des radioaktiven Tracers als auch des kalten Hormons (□—□) dargestellt (Methodik s. Text).

Wie Abbildung 18 zeigt, ergab sich durch den Einengschritt eine Parallelverschiebung der Eichkurve um ca. 15 %. Eine deutliche Verminderung dieses Fehlers konnte erreicht wer-

den, wenn der radioaktive T_3 -Standard erst nach dem Eindampfen der Probe zusammen mit dem Schwangerenserum zugegeben wurde (Abbildung 18 Eichkurve $\Delta-\Delta$). Dieses Phänomen konnte nicht sicher geklärt werden.

4.3.5.2.3. Sephadex LH-20

Nach einem Spülschritt mit 5 ml Aqua bidest. konnte T_3 von den Sephadex LH-20-Konzentriersäulen mit jeweils 3 ml Methanol, Methanol-Ammoniak-Gemisch oder Aminen wie z.B. Dimethylamin in einem scharfen Peak eluiert werden. Nach vollständigem Eindampfen im geschlossenen System bei 60°C lag die Wiederfinderate um 90 %. Die eingeeengten Proben wurden, genauso wie bei Bio-Rex-70 beschrieben (s. 4.3.5.2.2.), behandelt. Hier ergab sich eine fast identische Diskrepanz zwischen Standardeichkurven mit und ohne Konzentrierschritt, bzw. mit vor- oder nachheriger Zugabe des T_3 - ^{125}J , wie bei Bio-Rex-70.

Die Verwendung von LH-20 bringt also gegenüber Bio-Rex-70, das sich leichter handhaben läßt, bei der CPBA keine Vorteile.

4.3.5.3. Elution von der Konzentriersäule und CPBA im geschlossenen System

Das Einengen der Eluate von den Konzentriersäulen ist einerseits zeitaufwendig und störanfällig. Andererseits ist aber eine competitive Proteinbindungsanalyse auf einer Sephadex G-25-Konzentriersäule, wie oben gezeigt wurde (s. 4.3.5.1.), im Prinzip möglich.

Das Ziel unserer weiteren Bemühungen war, die Elution von der Konzentriersäule mit der competitiven Proteinbindungsanalyse für T_3 im geschlossenen System zu verbinden. Dazu ist es erforderlich, daß das Eluat von den Konzentriersäulen in einer schmalen Bande auf der nachfolgenden Sephadex

G-25-Säule wieder adsorbiert wird. Analog der Verknüpfung der Extraktion der Schilddrüsenhormone aus dem Serum mit der T_3 - T_4 -Trennung (s. 4.3.1., 4.3.2.), zeigte sich auch hier eine Säulenkombination von dem Kationenaustauscher SP-Sephadex C-25 und Sephadex G-25 superfine am besten geeignet.

4.3.5.3.1. Konzentriersäule

Wie Abbildung 19 zeigt, wird T_3 mit 0,02 N KOH in einem deutlich schmäleren Peak von der SP-Sephadex C-25-Säule eluiert als von AG 50 W-X 4 bzw. AG 50 W-X 2.

Vor der Elution mit KOH ist ein Austausch der H^+ -Gegenionen des Kationenaustauschers gegen K^+ -Ionen erforderlich. Das gelingt durch Spülen der Säule mit 1 N Kaliumchloridlösung. Aber es dauert sehr lange, bis alle Wasserstoffionen entfernt sind, da die Kaliumchloridlösung nicht in der Lage ist, die entfernten H^+ -Ionen abzupuffern. Besser eignet sich eine 1 N Kaliumacetat-Lösung, die einerseits die H^+ -Ionen vom Austauscher verdrängt, andererseits aber die freien H^+ -Ionen abpuffert, was sich durch einen schnellen Umschlag des pH-Wertes des Eluates vom Sauren zum Neutralen zeigt.

Da das Kaliumacetat aber auch das alkalische Elutionsmittel (0,02 N KOH) abpuffert und somit den Elutionspeak verbreitert, bietet sich folgendes Verfahren zum Kationenaustausch an:

Nach Konzentrierung des T_3 -Peaks wird die Austauschersäule mit 1 N Kaliumacetatlösung gespült, bis das Eluat zum Neutralen umgeschlagen ist. Anschließend werden die Acetationen durch kurzes Nachwaschen mit 1 N Kaliumchloridlösung eluiert und verworfen.

Als Elutionsmittel eignen sich 0,01 N - 0,1 N NaOH oder KOH, bei höherer Normalität verbreitert sich erstaunlicherweise der Elutionspeak. Dieser ist auch von der Durchfließgeschwindigkeit abhängig.

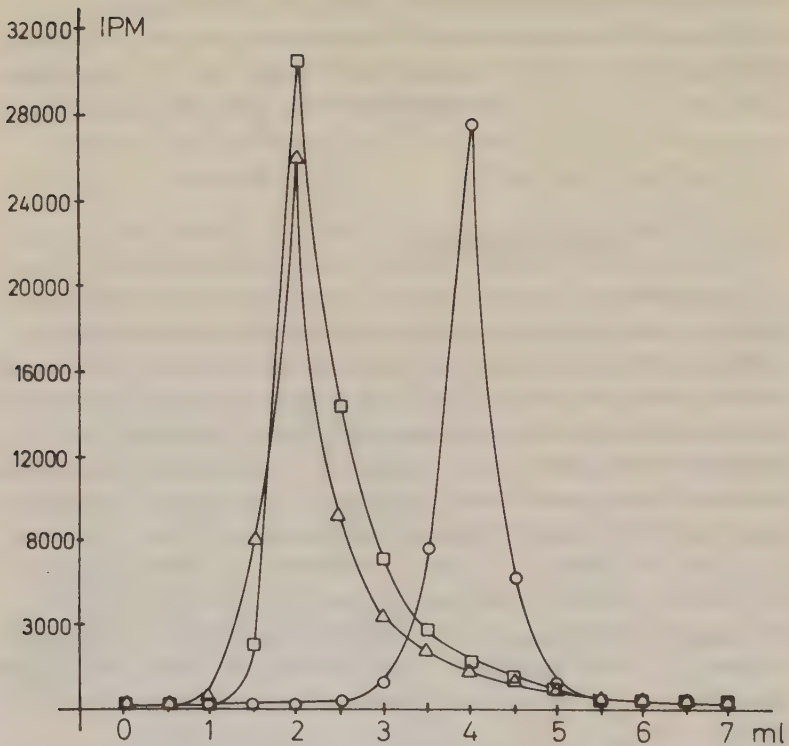


Abb.19: T_3 -Elutionsdiagramme von Kationenaustauschern
Dargestellt sind die Elutionsdiagramme von $T_3^{-125}J$
mit 0,02 N KOH von 1 ml AG 50 W-X 4 ($\square-\square$),
1 ml AG 50 W-X 2 ($\triangle-\triangle$) und 2 ml SP-Sephadex
C-25 ($\circ-\circ$).

Zur Elution des T_3 -Peaks von 2 ml SP-Sephadex C-25 hat sich als Elutionslösung 0,02 N Kalilauge bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,25 ml/min bewährt. Die Volumenschwankungen des Austauschers, die durch Verwendung verschieden normaler Lösungen auftreten, bereiten technisch keine Schwierigkeiten.

4.3.5.3.2. Adsorption des T_3 auf Dextrangelsäulen

Bei Ansäuerung des Eluats der SP-Sephadex C-25-Säule durch kontinuierliches Zuspeisen von 0,1 N HCl (0,25 ml/min) wird T_3 in einer schmalen Bande auf einer Sephadex G-25 superfine-Säule adsorbiert. Hierbei sind 2 ml Gelbett ausreichend.

4.3.5.3.3. T_3 -Nachweis nach Adsorption auf Dextrangel

Nach Umpufferung der Sephadex-Säule mit Barbitalpuffer pH 8,6 kann die TBG-Lösung angesaugt und die competitive Proteinbindungsanalyse durchgeführt werden.

Abbildung 20 zeigt die so gewonnenen Eichkurven auf Säulen mit Sephadex G-25 in Abhängigkeit verschiedener Korngrößen und verschiedener Gelbettvolumina.

Die weitaus beste Kurve wurde mit 2 ml Sephadex G-25 superfine gewonnen; die %F-Rate zeigt zwischen 0 und 10 ng T_3 -J einen Anstieg um 50 %.

Während auf dieser 2 ml-Säule die Konzentrierung des T_3 -Peaks noch möglich ist, reicht das Gelbettvolumen von 2 ml Sephadex G-25 fine oder 1,5 ml superfine nicht mehr aus.

Bei nochmaliger Überprüfung der besten TBG-Lösung für dieses System stellte sich heraus, daß sich bei Elution mit 1 ml 1:30 verdünntem Nullserum (s. 3.1.1.), 1:30 verdünntem Serum eines mit T_3 supprimierten Patienten und 1:40 verdünntem Schwangerenserum, die jeweiligen Eichkurven nahezu deckten. Da jedoch die Eichkurve des Nullserums gegenüber den anderen im unteren Bereich etwas steiler war, wurde dieses weiterhin als TBG-reiches Serum verwendet.

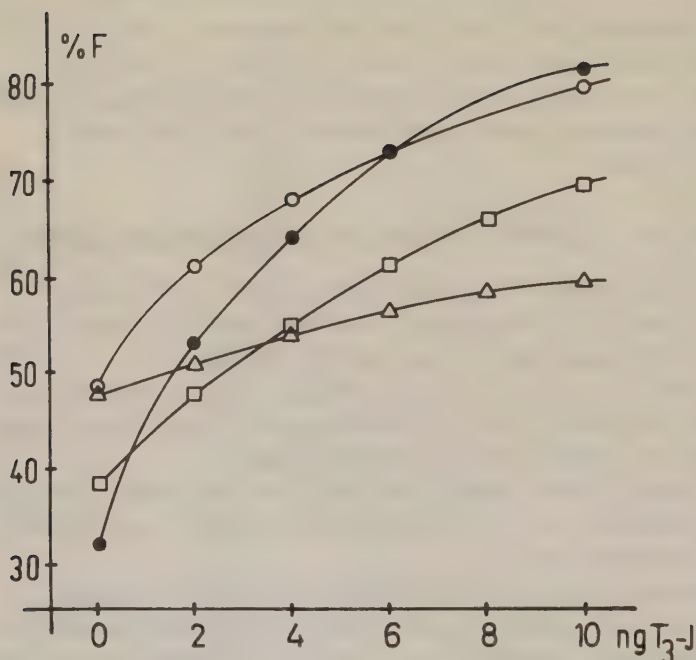


Abb. 20: T_3 -Standardeichkurven in Abhängigkeit von Korngröße und Menge des Dextrangels

Aufgezeichnet sind die Standardeichkurven von 0 - 10 ng T_3 -J mit 0,05 M Natriumbarbitalpuffer pH 8,6 auf 2 ml Sephadex G-25 superfine (●—●), 4 ml Sephadex G-25 superfine (○—○), 4 ml Sephadex G-25 fine (□—□) und 4 ml Sephadex G-25 coarse (△—△).

4.3.5.4. Diskussion

Die Steilheit, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Standarddeichkurve für T_3 wird im wesentlichen bestimmt durch die Menge an Dextrangel, durch die Adsorption des T_3 an Sephadex in einer möglichst schmalen Bande und durch die Verdünnung der TBG-Lösung. Deshalb war die competitive Proteinbindungsanalyse für T_3 auf einer Sephadex G-25-Konzentriersäule, bei der ein Gelvolumen von 5 ml erforderlich ist, nicht möglich.

Im Prinzip kann die T_3 -Bestimmung nach Einengen des flüchtigen Eluates von der Konzentriersäule mit Bio-Rex-70 oder Sephadex LH-20 durchgeführt werden. Allerdings ist dieses Vorgehen zeitaufwendig, stör anfällig und nur schwer standardisierbar. Ein relativ einfaches, gut automatisierbares und damit standardisierbares Verfahren ist dagegen die Kombination im geschlossenen System von Elution von der Konzentriersäule und gleichzeitiger Adsorption auf der Dextrangelsäule, auf der die CPBA durchgeführt wird.

4.4. Halbautomatische Bestimmung von Trijodthyronin im Serum

4.4.1. Extraktion aus dem Serum

Zur Extraktion der Hormone T_3 und T_4 wurden jeweils 3 ml Serum simultan auf 25 mit 0,1 N Salzsäure vorgespülte Kationenaustauschersäulen mit Hilfe einer 25-Kanal-Peristaltikpumpe aufgetragen (steuerbare 25-canal micropump, Fa. Ismatec, Zürich). Diese Säulen bestehen jeweils aus dem Zylinder einer 5 ml Einmalspritze (Fa. Braun, Melsungen) und sind mit 5 ml Gel SP-Sephadex C-25, H^+ -Form gefüllt (Abbildung 21a). Die Temperaturkonstanz wird durch Anordnung der Säulen in einem Thermoblock ($t = 30^\circ C$) gewährleistet (s. 4.3.1.).

Bei weiterem Spülen für 20 Minuten mit 4,2 ml 0,1 N HCl werden die vom Hormon befreiten Proteine bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,21 ml/min eluiert und über einen 3-Wege-Hahn verworfen (Abbildung 21b).

Durch Nachwaschen mit 3 ml 1 M Kaliumacetatlösung und anschließend 6 ml 1 N Kaliumchloridlösung - durch Erhöhung der Pumpgeschwindigkeit auf 0,31 ml/min in 10 bzw. 20 Minuten - wird die Austauschersäule neutralisiert und gleichzeitig von der H^+ - in die K^+ -Form gebracht (s. 4.3.5.3.1.).

4.4.2. Auftrennung von T_3 und T_4

Nach vollständiger Umpufferung können T_3 und T_4 jetzt mit ca. 12 ml 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 in 60 Minuten in einem schmalen Peak von den 1. Austauschersäulen eluiert werden. Dazu werden nach Verwerfen eines Vorlaufs von 10 Minuten, entsprechend 2,1 ml, die 3-Wege-Hähne so gestellt, daß der Hormonpeak jeweils gleich auf die 25 10 ml-Sephadex G-25 superfine Trennsäulen aufgetragen

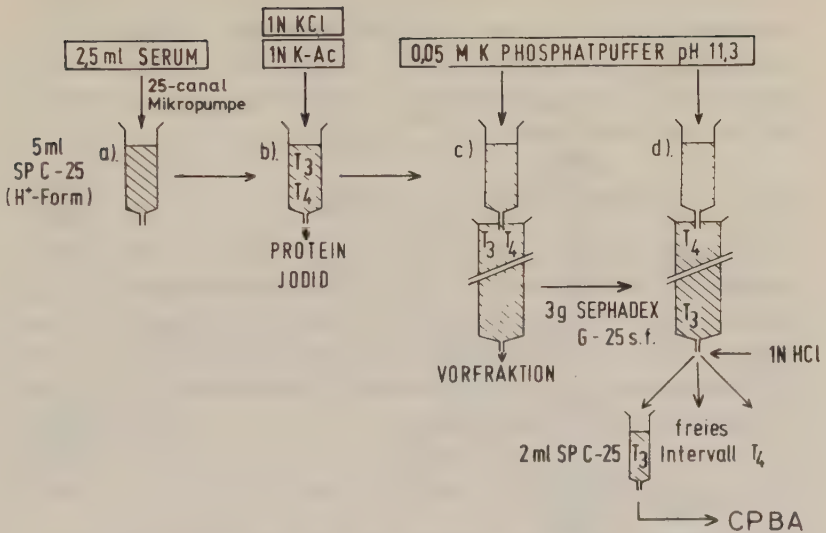


Abb.21: Schematische Darstellung der Trennung von T_3 und T_4

Die Abbildung zeigt schematisch die halbautomatische Trennung von T_3 und T_4 im geschlossenen System.

- Auftragen des Serums auf die Extraktionssäule
- Extraktion von T_3 und T_4 aus dem Serum
- Elution des T_3 und T_4 von der Extraktionssäule
- Abtrennung des T_3 vom T_4 mit anschließender Konzentrierung des T_3 -Peaks auf einer Austauschersäule (Methodik s. Text).

wird (Abbildung 21c). Diese sind ebenfalls in einem Wärmeblock angeordnet und werden bei 30°C temperaturkonstant gehalten. Auf diesen Säulen wird durch Chromatographie mit dem gleichen 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 11,3 T_3 von T_4 getrennt (Abbildung 21d). T_3 wird in einem kleinen Volumen von ca. 20 ml von der 160. bis 240. Minute nach Start der Elution von der Trennsäule eluiert; bis zur Elution des T_4 -Peaks findet sich ein freies Intervall von 80 Minuten (s. Abbildung 12).

Zur Überprüfung der ausreichenden Trennung und Wiederfinden wurde bei jedem Versuchsdurchgang jeweils eine radioaktive Kontrolle (Inkubationsgemisch aus 2 ml Serum, 0,5 ml T_3 - ^{125}J und 0,5 ml T_4 - ^{125}J -Standardlösung) über das ganze System gegeben.

4.4.3. Konzentrierung der T_3 -Peaks

Die T_3 -Peaks von den Trennsäulen werden auf 25 2 ml-SP-Sephadex C-25-Säulen (s. 4.2.2.) im geschlossenen System konzentriert (Abbildung 21d). Über einen 3-Wege-Hahn werden die Eluate der Trennsäulen kontinuierlich mit 1 N HCl (2. Peristaltikpumpe, 0,05 ml/min) angesäuert und auf die Konzentriersäulen aufgetragen.

4.4.4. Nachweis von T_3 mit der CPBA

Die Konzentriersäulen werden nun aus dem chromatographischen System gelöst. Auf jede Säule werden 0,2 ml nachgereinigte T_3 - ^{125}J -Standardlösung (s. 4.2.1.) aufgetragen und danach mit 1,25 ml 0,1 N HCl in 5 Minuten (Pumpgeschwindigkeit 0,25 ml/min) gespült.

Hierauf wird aus den Gefäßen A_1 und B_1 (Abbildung 22) 5 Minuten 1 N Kaliumacetat und darauf 10 Minuten 1 N Kaliumchloridlösung angesaugt und damit die Austauschersäule umgepuffert (s. 4.3.5.3.1.). Anschließend wird 15 Minuten mit 0,02 N Kalilauge eluiert. Ein Vorlauf von 5 Minuten wird verworfen und dann der T_3 -Peak, wie in Abbildung 22 angezeigt, auf einer 2 ml Sephadex G-25 superfine-Säule durch kontinuierliches Zuspeisen von 0,1 N Salzsäure (Pumpgeschwindigkeit 0,25 ml/min) wieder konzentriert. Danach wird die Austauschersäule über den 3-Wege-Hahn ausgeschaltet und die Sephadexsäule mit 2,5 ml 0,05 M Natriumbarbitalspuffer pH 8,6 aus dem Vorratsgefäß A_2 umgepuffert (Ab-

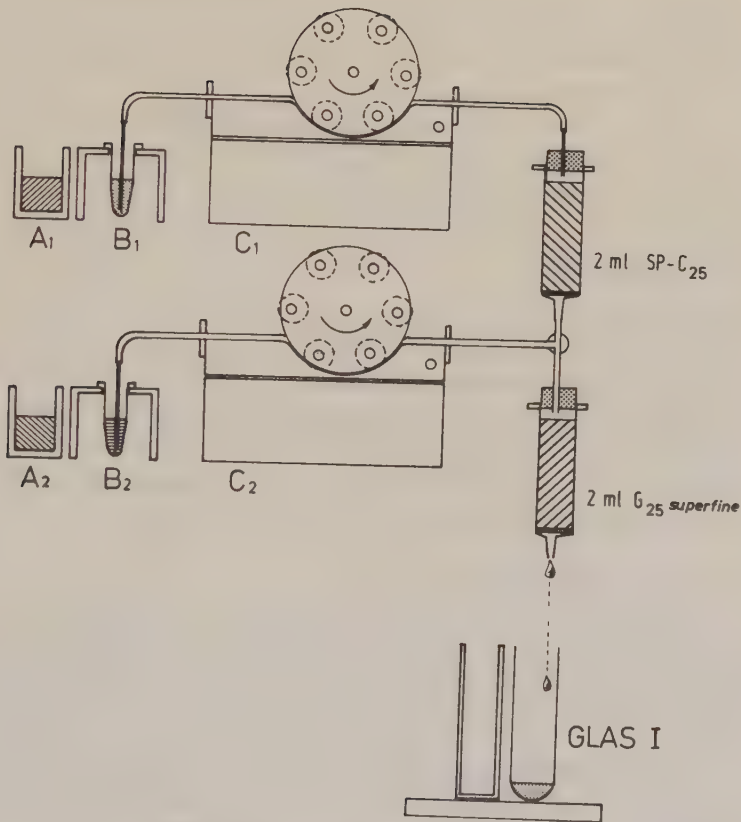


Abb.22: Längsschnitt der Apparatur zur T₃-Bestimmung

Die Abbildung zeigt schematisch einen Längsschnitt der Apparatur für die simultane Säulenchromatographie zur Bestimmung des Serum-T₃-Gehalts durch competitive Proteinbindungsanalyse nach Abtrennung des Hormons vom Serum und vom Thyroxin.

A₁, A₂ = Vorratsgefäße
B₁, B₂ = Eppendorfgefäße
C₁, C₂ = Proportionierpumpen
(s. auch Abbildung 6a).

bildung 22). Daraufhin werden aus dem Eppendorfgesäß B₂ 0,5 ml Nullserum (1:15 verdünnt) quantitativ abgesaugt und der TBG-gebundene Anteil unter weiterem Pufferspülen in das Glas I eluiert und gesammelt.

Auch bei dem Nachweisschritt sind 25 Säulen parallel angeordnet, so daß 25 Proben in einem Durchgang gleichzeitig bestimmt werden können (s. Abbildung 6b).

4.4.5. Auswertung

4.4.5.1. Erstellen von Eichkurven

Zur Erstellung von Eichkurven werden auf 2 ml, mit 0,1 N HCl vorgespülten SP-Sephadex C-25-Säulen jeweils 0,2 ml gereinigter T₃-¹²⁵J-Standard und 0,2 ml T₃-Eichstandardlösung (0 - 10 ng T₃-¹²⁷J/200 µl) aufpipettiert und dann wie die Konzentrationsäulen (s. 4.4.4.) behandelt.

4.4.5.2. Berechnung

Der dextrangelgebundene Anteil des T₃-¹²⁵J wird ohne vorherige Elution direkt auf der Säule im Bohrloch gemessen und als %F-Rate zur Gesamtaktivität (Säule + Glas I) berechnet.

Die an der Eichkurve abgelesenen Werte nach der gesamten Chromatographie wurden mit der mittleren Ausbeute von 80 % korrigiert.

4.5. Ergebnisse

4.5.1. Qualitätskontrolle

4.5.1.1. Blancprobleme

Die über das gesamte System mit und ohne Nullserum gewonnenen Eichkurven deckten sich nach Korrektur mit der mittleren Wiederfinderate (80 %) nach der Chromatographie mit den Standardeichkurven (s. 4.4.5.1.); Blancs traten somit nicht auf (Abbildung 23). Ebenso lagen die entsprechenden Meßwerte von Serumverdünnungen eines mit Thybon supprimierten Patienten auf der Standardeichkurve (Abbildung 23).

Wurde allerdings der nachgereinigte T_3 - ^{125}J -Standard (s. 4.2.1.) mit einer Eichkurve über das gesamte System chromatographiert, so fand sich eine Parallelverschiebung gegenüber der Standardeichkurve um ca. 10 %, wie schon bei den Eichkurven nach Einengen der Bio-Rex-70 bzw. LH-20-Eluate beobachtet wurde (s. 4.3.5.2.2.).

Eine eindeutige Erklärung für diesen Blanc fanden wir nicht (43). Wegen der besseren Standardisierbarkeit unseres T_3 -Nachweises wurde deshalb die T_3 - ^{125}J -Lösung grundsätzlich erst nach der Trennung von T_3 und T_4 zugegeben. Nachteile ergaben sich bei diesem Vorgehen nicht, da bei den gut reproduzierbaren Wiederfinderten von ca. 80 % die Verwendung eines internal Standards nicht erforderlich war.

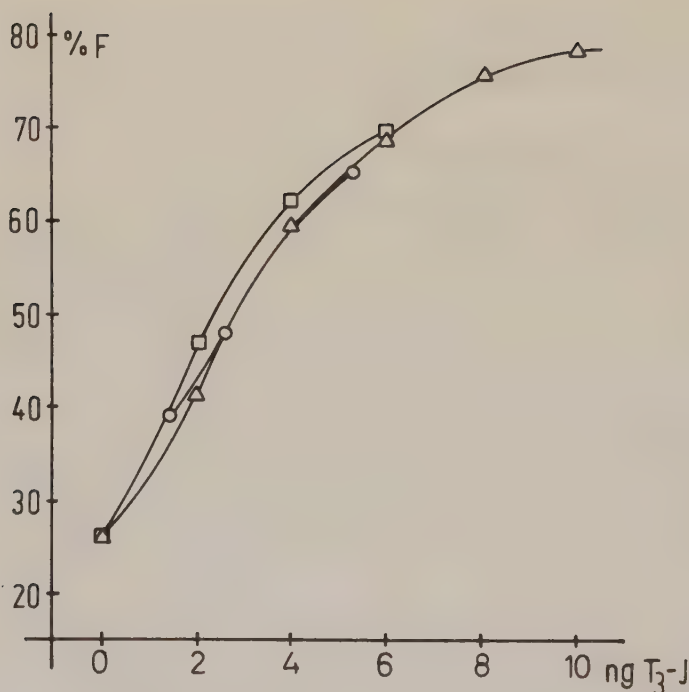


Abb.23: T₃-Standardeichkurven und Serumverdünnungskurve

Die Abbildung zeigt die Eichkurve ohne Chromatographie der Eichstandards über das Trennsystem (Δ — Δ) und bei Chromatographie der Eichstandards über das ganze Trennsystem ($\square$ — $\square$). Weiterhin wurde das Serum eines mit Thybon suppressierten Patienten gemessen und an der Eichkurve abgelesen. Die gefundenen %F-Raten der Proben mit 1:2 und 1:4 verdünntem Serum wurden bei den entsprechenden Verdünnungswerten in das Koordinatensystem eingezeichnet ($\circ$ — $\circ$).

4.5.1.2. Störung durch endogenes T_4

Die Qualität jeder T_3 -Bestimmung ist vorwiegend davon abhängig, inwieweit das Thyroxin in den Nachweis mit eingeht. Da im Serum ca. 40 mal mehr T_4 als T_3 vorhanden ist, genügt eine Kontamination des T_3 -Peaks mit z.B. 1 % des T_4 , um einen um 40 % erhöhten T_3 -Wert zu erhalten, da sich T_4 im T_3 -Nachweis wie T_3 verhält. Beim Proteinbindungsnachweis ist der Fehler durch die stärkere Proteinbindung des Thyroxins jedoch noch größer. So werden hier 1 ng T_4 als ca. 2 ng T_3 nachgewiesen, so daß sich der Fehler in der T_3 -Bestimmung bei 1 % Verseuchung von 40 % auf 80 % erhöht. Daraus folgt, daß die T_3 -Bestimmung mit der CPBA-Technik nur nach vollständiger Trennung von T_3 und T_4 möglich ist.

Mit dem beschriebenen Verfahren kann man den T_3 -Peak von dem T_4 -Peak bei radioaktiver Messung durch ca. 20 ml eines radioaktivfreien Intervalls trennen. Wurde andererseits gereinigtes T_4 - ^{125}J chromatographiert, so lag die Kontamination des T_3 -Peaks durch dieses T_4 unter 0,1 % (4,35,60).

4.5.1.3. Präzision in der Serie

Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Präzision in der Serie war bei einem Variationskoeffizienten von 11,3 % zufriedenstellend.

4.5.1.4. Reproduzierbarkeit

Eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Methode wird in Abbildung 24 an Hand der Streuung von 8 an 6 verschiedenen Tagen gewonnenen Eichkurven aufgezeigt.

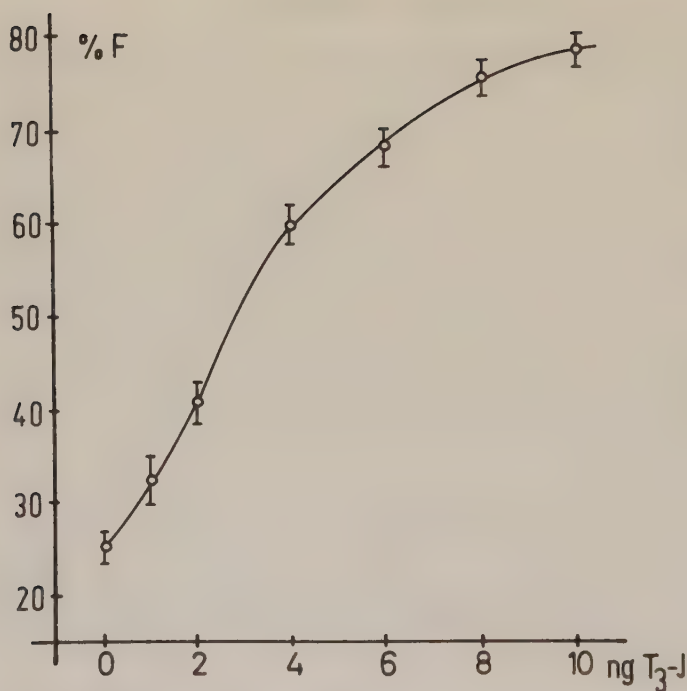


Abb.24: Standardeichkurve für T₃-¹²⁷J im Serum

Die Abbildung zeigt Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen ($\pm s$) der einzelnen Eichpunkte von 8 an 6 verschiedenen Tagen gewonnenen Eichkurven.

4.5.1.5. Normalbereich

Der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) unserer Methode wurde an einem Kollektiv von 13 schilddrüsengesunden Personen ermittelt. Er liegt zwischen 1,00 und 1,78 ng T_3 /ml (bzw. 0,65 und 1,16 ng T_3 -J/ml). Er zeigt damit eine gute Übereinstimmung mit dem Normalbereich von 1,06 bis 1,86 ng T_3 /ml, der mit dem gleichen chromatischen Verfahren, aber microchemischen Jodnachweis gewonnen wurde (33,35,60).

4.5.1.6. Störfaktoren

Zur Frage, ob die Bestimmung des T_3 mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsanalyse durch exogene Jodkontamination (z.B. Röntgenkontrastmittel) gestört wird, wurden 3 Serumproben von klinisch euthyreoten Patienten 5 Tage nach Biligrafininjektion auf den T_3 -Gehalt hin untersucht. Die hierbei gefundenen Werte von 1,30, 1,61, 1,55 ng T_3 /ml liegen alle in dem vorher errechneten Normalbereich, so daß eine Beeinflussung der Meßwerte durch jodhaltige Röntgenkontrastmittel ausgeschlossen werden kann.

4.5.2. Klinische Ergebnisse und Diskussion

Bei dekompensierten autonomen Adenomen (3) findet man unter der Berücksichtigung der T_4 -Spiegel und des T_3 - in vitro-Tests verschiedene Gruppen, nämlich Patienten, die in Übereinstimmung mit dem klinischen Bild durch erhöhte T_4 -Spiegel als hyperthyreot zu erkennen sind (41). In der 2. Gruppe gibt es Patienten, bei denen die peripheren Zeichen einer vermehrten Schilddrüsenhormonwirkung (Tachykardien, Herzrhythmusstörungen, Gewichtsabnahme etc.) bestehen, bei denen sich aber durch die konventionelle Schilddrüsenlaboratoriumsdiagnostik die Diagnose einer Hyperthyreose nicht bestätigen läßt. Bei diesen Patienten liegt die Vermutung nahe, daß die klinisch hyperthyreotische Stoffwechsellage Folge einer vermehrten T_3 -Sekretion sein kann. Für diese Vermutung sprechen auch die supprimierten TSH-Spiegel, die auch auf TRH nicht stimulierbar waren (54,55).

Aus diesem Grunde wurden die T_3 -Spiegel bei 14 Patienten mit autonomen Adenomen* der Schilddrüse gemessen:

Dekompensierte autonome Adenome mit erhöhtem T_4 -Spiegel	N = 5
dekompensierte autonome Adenome mit normalem T_4 -Spiegel	N = 7
kompenierte autonome Adenome	N = 2

4.5.2.1. Dekompensierte autonome Adenome mit erhöhtem T_4 -Spiegel

Bei den Patienten mit dekompensierten autonomen Adenomen und erhöhten T_4 -Spiegeln fällt auf, daß alle, mit Ausnahme des Patienten F.G. T_3 -Spiegel von über 3,0 ng T_3 /ml haben,

* Die nuklearmedizinische Diagnostik wurde in der Klinik und Poliklinik für Radiologie der Univ. München (Direkt. Prof.Dr.med. J.LISSNER) durchgeführt. Die Diagnose eines kompensierten bzw. dekompensierten autonomen Schilddrüsenadenomes wurde im Anschluß an die erste Szintigraphie durch eine zweite nach Suppression mit Trijodthyronin bzw. nach Stimulation mit TSH (Thyreostimulin^R, Organon) gesichert (54). Herrn Priv.Do. Dr. med. H.G.HEINZE danken wir für die freundliche Überlassung der Befunde.

so daß sowohl ihre T_3 - als auch T_4 -Spiegel über dem Normalbereich liegen (Tabelle 1 - Gruppe 1). Nur bei dem Patienten F.G. fanden sich ein erhöhter T_4 -Spiegel und ein erhöhter Index des freien Schilddrüsenhormons bei allerdings nur leicht erhöhtem T_3 -Spiegel.

4.5.2.2. Dekompensierte autonome Adenome mit normalem T_4 -Spiegel

In der Gruppe der Patienten mit normalen T_4 -Spiegeln bestand klinisch der Verdacht einer Schilddrüsenüberfunktion, der durch die Bestimmung des T_4 -Spiegels und des Indexes des freien Schilddrüsenhormons nicht bestätigt werden konnte.

Bei 4 von 6 Patienten konnten die klinischen Zeichen der gesteigerten Schilddrüsenhormonwirkung durch eine signifikante Mehrsekretion von T_3 erklärt werden (Tabelle 1 - Gruppe 2a).

Interessante Werte zeigte auch der Patient M.E., welchem zweimal in monatelangem Abstand Blut entnommen wurde, als sich klinische Beschwerden einstellten (Tabelle 1 - Gruppe 2b). Während sich in dieser Zeit der Thyroxinspiegel praktisch nicht veränderte, stieg der T_3 -Gehalt von einem normalen Ausgangswert auf einen hyperthyreoten Wert an. Bei diesem autonomen Adenom konnte auf Grund intermittierend erhöhter T_3 -Produktion das Bild einer phasenhaften Thyreotoxikose bewiesen werden (55).

Nur 2 Patienten (Tabelle 1 - Gruppe 2c) zeigten normale T_3 -Spiegel. Auch bei ihnen waren die TSH-Spiegel supprimiert und durch TRH nicht stimulierbar, so daß Zweifel an der euthyreotischen Stoffwechsellaage bestehen. Ob es sich bei diesen Patienten um phasenhaft verlaufende T_3 -Thyreotoxikosen handelt, kann nicht entschieden werden, da Verlaufsbeobachtungen fehlen.

4.5.2.3. Kompensierte autonome Adenome

Es wurden nur 2 Fälle mit kompensierten autonomen Adenomen (3) untersucht. Bei der Patientin S.M. lag der T_4 -Spiegel an der unteren Grenze und der T_3 -Spiegel im Bereich der Norm. Wegen der normalen Stimulierbarkeit der TSH-Spiegel durch TRH konnte z.Z. der Untersuchung eine euthyreotische Stoffwechsellage angenommen werden.

Eine Deutung der Laboratoriumsbefunde und der nuklearmedizinischen Untersuchungsergebnisse (kompensiertes, autonomes Adenom, normaler T_4 -Spiegel, erniedrigter T_3 -Spiegel, aber fehlende Stimulierbarkeit der TSH-Sekretion) ist bei der Patientin G.C. nicht möglich (Tabelle 1 - Gruppe 3).

4.5.2.4. Hyperthyreosen

Bei dem Patienten R.E. (Tabelle 1 - Gruppe 4a) bestand klinisch und radiologisch durch einen negativen T_3 -Suppressionstest der Verdacht auf eine Hyperthyreose, die durch den T_4 -Spiegel von $5,7 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ und normalem Index des freien Schilddrüsenhormons von $2,31 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ nicht bestätigt werden konnte. Durch Nachweis eines erhöhten T_3 -Spiegels konnte die Diagnose einer T_3 -Thyreotoxikose gestellt werden. Als weiterer Hinweis ergab sich eine fehlende Stimulierbarkeit der TSH-Spiegel.

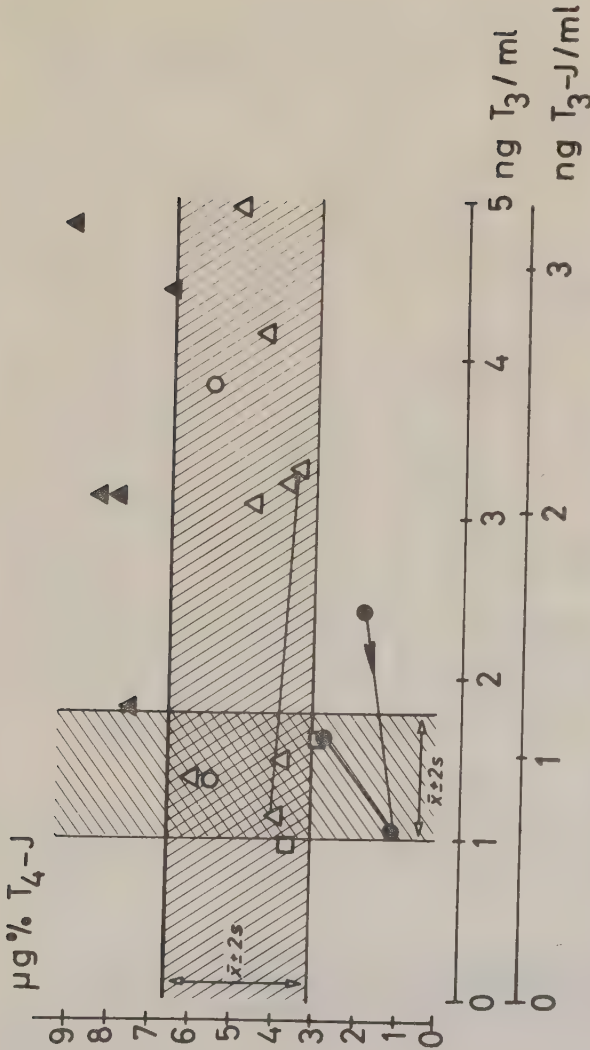


Abb. 25: T₃- und T₄-Serumwerte von autonomen Adenomen und Hyperthyreosen

Aufgezeichnet sind jeweils der T₄-Gehalt und der T₃-Spiegel des untersuchten Serums. Die Normalbereiche ($\bar{x} \pm 2s$) beider Hormonwerte sind schraffiert dargestellt.

- ▲ = dekompenzierte autonome Adenome mit erhöhtem Thyroxinspiegel
- △ = dekompenzierte autonome Adenome mit normalem Thyroxinspiegel (△—△) phasenhafte Thyreotoxikose
- = kompenzierte autonome Adenome
- = unbehandelte Hyperthyreosen
- = behandelte Hyperthyreose (s. Text).

	T_3 ng/ml	T_4 -J μ g/ 100 ml	freier T_4 - Index μ g/100 ml	Δ TSH 30 min μ E/ml
1. <u>dekomp.aut.Adenome</u> mit erhöhtem T_4 - <u>Spiegel</u>				
F.G.	1,82	7,5	3,41	o
S.B.	3,14	8,3	4,02	o
B.R.	3,14	7,8	3,94	o
S.M.	4,45	6,6	2,75	o
G.J.	4,84	9,0	6,29	o
2. <u>dekomp.aut.Adenome</u> mit normalem T_4 - <u>Spiegel</u>				
a. O.A.	3,11	4,6	1,49	o
Z.H.	3,22	3,7	0,97	o
S.E.	4,16	4,4	1,70	o
B.M.	4,97	5,0	1,96	o
b. M.E. ₁	1,14	4,0	1,40	o
M.E. ₂	3,31	3,5	1,22	o
c. B.A.	1,39	6,0	1,90	o
W.M.	1,50	3,8	1,33	o
3. <u>komp.aut.Adenome</u>				
S.M.	1,61	3,0	0,84	7,3
G.C.	0,97	3,7	1,20	o
4. <u>Hyperthyreosen</u>				
a. unbehandelt				
R.E.	3,84	5,7	2,31	o
I.G.	1,36	5,6	2,00	o
b. behandelt				
S.F. ₁	2,43	1,9	0,32	o
S.F. ₂	1,06	1,1	1,20	o
S.F. ₃	1,65	2,9	2,00	o
Normalbereich $\bar{x} \pm 2s$	1,00 - 1,78	3,1 - 6,6	1,33 - 2,50	2,73 - 23,6

Tab.1: T_3 -Spiegel, T_4 -Werte, Indexwerte des freien Schilddrüsenhormons und Δ TSH-Werte von autonomen Adenomen und Hyperthyreosen.

Dagegen konnte trotz des klinischen Verdachtes auf eine Hyperthyreose und fehlender Stimulierbarkeit des TSH-Spiegels bei der Patientin I.G. (Tabelle 1 - Gruppe 4a) eine T_3 -Hyperthyreose nicht nachgewiesen werden.

Bei dem Patienten S.F. (Tabelle 1 - Gruppe 4b) handelt es sich um eine medikamentös und operativ behandelte Hyperthyreose. Die T_3 -Spiegel wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung untersucht. Die Werte zu Beginn der Behandlung standen uns leider nicht zur Verfügung. 29 Tage nach der mit Favistan^R behandelten thyreotoxischen Krise fand sich noch eine Erhöhung des T_3 -Spiegels (Abbildung 25 ●—●) bei schon signifikant erniedrigtem T_4 . 20 Tage nach der Strumaresektion, noch ohne Strumarezidivprophylaxe (56), lagen die T_3 - und T_4 -Spiegel unter der Norm. Auffällig ist, daß die TSH-Spiegel noch supprimiert waren *. 28 Tage später, während der täglichen Einnahme von 25 µg T_4 und 5 µg T_3 (1/4 Tablette Novothyral^R) war der T_3 -Spiegel bereits normalisiert, während der T_4 -Spiegel noch an der unteren Grenze der Norm lag.

Zu weiteren Aussagen sind die Untersuchungen an einem größeren Kollektiv von Hyperthyreosen erforderlich.

* Die radioimmunologischen TSH-Bestimmungen wurden von Frau Priv.Doiz.Dr.med.C.R.PICKARDT und Herrn Dr.med.Dr.rer. nat. F.ERHARDT durchgeführt, denen hierfür gedankt sei (54, 55, 66).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Nach dem Prinzip der competitiven Proteinbindungsanalyse wurde sowohl eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Thyroxins im Serum, als auch ein Verfahren zur separaten Messung des Trijodthyroninspiegels im Serum ausgearbeitet.

5.1. Thyroxinbestimmung

Durch Automatisierung des Thyroxinnachweises durch competitive Proteinbindungsanalyse ist die Bestimmung von 100 Serumpuben täglich bei einem Variationskoeffizienten von 3,4 % bequem möglich. Die Technik der competitiven Proteinbindungsanalyse ermöglicht auch die Bestimmung in jodverseuchtem Serum, so daß auch die Hormonspiegel nach Röntgenkontrastmittelapplikation fehlerlos gemessen werden können.

5.2. Trijodthyroninbestimmung

Die Messung des Trijodthyroninspiegels durch competitive Proteinbindungsanalyse nach säulenchromatographischer Abtrennung der Serumproteine und des Thyroxins ermöglicht eine halbautomatische T_3 -Bestimmung in einem geschlossenen System bei einem Variationskoeffizienten von 11,3 %. Der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) lag bei einem Kollektiv von 13 schilddrüsengesunden Personen zwischen 1,0 und 1,78 ng T_3 /ml. Bei 14 Patienten mit autonomen Adenomen der Schilddrüse wurde der Trijodthyroninspiegel des Serums bestimmt. Dabei ergab sich, daß mit einer Ausnahme alle Fälle von dekompensierten autonomen Adenomen mit erhöhtem T_4 -Spiegel auch erheblich erhöhte T_3 -Spiegel zeigten, während bei 7 Patienten mit dekompensiertem autonomen Adenomen mit normalem T_4 -Spiegel nur 4 einen erhöhten T_3 -Spiegel hatten. Bei einem Patienten muß eine phasenhaft verlaufende T_3 -Thyreotoxikose angenommen werden. Die beiden untersuchten Fälle mit kompensierten autonomen Adenomen lagen mit ihrem T_3 -Wert im Normalbereich bzw. darunter.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRIGHT, E.C., F.C.LARSON and W.D.DEISS: Thyroxine-Binding Capacity of Serum α -Globuline in Hypothyroid, Euthyroid and Hyperthyroid Subjects.
J. Clin. Invest. 34, 44 (1955).
2. BENOTTI, J. and N.BENOTTI: Protein Bound Iodine, Total Iodine and Butanol-extractable Iodine by Partial Automation.
Clin. Chem. 9, 409 (1963).
3. BÖRNER, W., E.MOLL, E.RAUH, A.POHNER, S.GREHN und G.RUPPERT: Diagnostik des autonomen Adenoms der Schilddrüse.
Dtsch. med. Wschr. 96, 1707 (1971).
4. BOROWZAK, H.: Methodische Probleme der getrennten Bestimmung von Trijodthyronin und Thyroxin im Serum.
Dissertation, Universität München (1974).
5. BOTSCH, H., B.SCHREIBER und K.OEFF: Serumkonzentration des Trijodthyronins beim autonomen Adenom der Schilddrüse.
Münch. med. Wschr. 50, 2181 (1972).
6. BRASE, A.: Gesamtthyroxin-Bestimmung zur Schilddrüsen-diagnostik.
Ärztl. Lab. 16, 65 (1970).
7. BRASE, A.: Verbesserung der Schilddrüsenfunktionsprüfung durch Kombination von In-vitro-Tests.
Med. Klin. 16, 604 (1971).

8. BRAVERMAN, L.E., N.A.DAWBER and S.H.INGBAR: Observations Concerning the Binding of Thyroid Hormones in Sera of Normal Subjects of Varying Ages. J. clin. Invest., 45, 1273 (1966).
9. BRAVERMAN, L.E., A.G.VAGENAKIS, A.E.FOSTER and S.H.INGBAR: Evaluation of a Simplified Technique for the Specific Measurement of Serum Thyroxine Concentration. J. clin. Endocr. 32, 497 (1971).
10. BÜTTNER, H.: Statistische Qualitätskontrolle in der klinischen Chemie. Z. klin. Chemie u. klin. Biochemie, 2, 41 (1967).
11. CASSIDY, C.E., J.BENOTTI and S.PENO: Clinical Evaluation of the Determination of Thyroxine Iodine. J. clin. Endocrin. 28, 420 (1968).
12. CLARK, F., D.B.HORN: Assessment of Thyroid Function by the Combined Use of the Serum Protein-Bound Iodine and Resin Uptake of ¹²⁵I-Triiodo-thyronine. J. clin. Endocr. 25, 39 (1965).
13. COUTSOFIDIS, T., A.GORDON: Effect of pH on the Binding of Thyroxine to Serum Proteins. Acta endocrin. 65, 409 (1970).
14. DAVIS, P.J., B.S.HANDWERGER and R.J.GREGERMAN: Thyroid Hormone Binding by Human Serum Prealbumin (TBPA). J. clin. Invest. 51, 515 (1972).

15. DETERMANN, H.: Gelchromatographie, Gelfiltration, Gel-permetation, Molekülsiebe, Ein Laboratoriums-buch.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
16. DIEM, K.: Documenta Geigy.
Wissensch. Tabellen, 6. Aufl., J.R. Geigy S.A., Basel (1960).
17. DORFNER, K.: Ionenaustauscher - Eigenschaften und Anwendungen. Zweite Auflage.
Walter de Gruyter & Co. Berlin (1964).
18. DOWLING, J.T., N. FREINKEL and S.H. INGBAR: Thyroxine-Binding by Sera of Pregnant Women, Newborn Infants and Women with Spontaneous Abortion.
J. Clin. Invest. 35, 1263 (1956).
19. DUSSAULT, J.H., R. LAM, D.A. FISHER: The Measurement of Serum Triiodothyronine by Double Column Chromatography.
J. Lab. Cl. Med. 77, 1039 (1971).
20. EKINS, P. and B. NEWMAN: Theoretical Aspects of Saturation Analysis.
Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium. Steroid Assay by Protein Binding.
March 1970.
21. FISHER, D.A. and J.H. DUSSAULT: Contribution of Methodological Artifacts to the Measurement of T_3 -Concentration in Serum.
J. clin. Endocrin. 32, 615 (1971).

22. FLODIN, P.: Dextran gels and their applications in gel filtration.
Dissertation, Uppsala 1962 85 pp.
23. GOLD, A., MURPHY, P.B. and C.J. PATTEE: Evaluations of the Diagnostic Validity of a New Method of Serum Thyroxine Assay.
Proc. Vth Internat. Thyroid Conference, Rome 1965, Abstr. 224.
24. GORDON, A. and T. COUTSOFTIDES: Thyroxine Binding Proteins of Human Serum at Physiological pH.
Acta endocr. 62, 217 (1969).
25. HABERMANN, J., J. HENNER, K. HORN, I. zur HORST and P.C. SCRIBA: Automatization of serum thyroxine determination and of T_3 -uptake test.
Acta endocr. (Kbh) 159, 7 (1972).
26. HALLHUBER, G.: Ein säulenchromatographisches Verfahren zur Auftrennung der Jodaminosäuren im Serum unter besonderer Berücksichtigung der Trennung von Trijodthyronin und Thyroxin.
Dissertation, München 1970.
27. HEINZE, H.G., J. BECKEBANS, K.W. FREY, J. RICHTER, H.W. PABST, K. SCHWARZ und P.C. SCRIBA: Über die Schilddrüsenfunktion der endemischen Struma.
Fortschr. Röntgenstr. 109 (1969).
28. HEINZE, H.G., K.W. FREY und P.C. SCRIBA: Methoden und Ergebnisse der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik im Bayr. Jodmangelgebiet.
Fortschr. Röntg. Nukl. Med. 106, 569 (1968).

29. HESCH, R.D., M.HÜFNER und A.v.z.MÜHLEN: Radioimmuno-assay of Triiodothyronine in Thyroid Diseases. Acta endocr. (Kbh) 159, 6 (1972).
30. HORN, K.: Zur klinischen Bedeutung der Bestimmung der Serumproteinbindung von Schilddrüsenhormonen. Dissertation, Universität München (1966).
31. HORN, K., H.BOROWZAK, J.HABERMANN, M.RETTIG, T.RUHL und P.C.SCRIBA: Total Serum T_3 and T_4 in Nontoxic Goiter and Autonomous Adenoma. Acta endocr. (Kbh) 159, 8 (1972).
32. HORN, K., J.HABERMANN, J.HENNER, I.zur HORST und P.C.SCRIBA: Automatisierte Schilddrüsenhormonanalytik im Serum: T_3 -in vitro-Test und Gesamt-Thyroxin (CPB). (Automatization of thyroid hormone analysis in serum T_3 uptake and total T_4 (CPB). Z. anal. Chem. 259, 222 (1972).
33. HORN, K., G.HALLHUBER, T.RUHL und P.C.SCRIBA: Separation and Microchemical Determination of Serum Triiodothyronine and Thyroxine. Acta endocr. (Kbh) 152, 85 (1971).
34. HORN, K., J.HENNER und P.C.SCRIBA: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. II. Automatisierter T_3 -in vitro-Test. Dtsch. Ges. f. Klin. Chemie Mitteilg. 2, 29 (1971).
35. HORN, K., T.RUHL und P.C.SCRIBA: Semiautomatic method for the separation and determination of total triiodothyronine and thyroxine in serum. Z. klin. Chem. 10, 99 (1972).

36. HORN, K. und P.C.SCRIBA: Klinisch-chemische Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. I. Bestimmung des proteingebundenen Jods im Serum (PB¹²⁷I). Dtsch. Ges. f. Klin. Chemie Mitteilg. 5, 3 (1970).
37. HORN, K. und P.C.SCRIBA: Zur PB¹²⁷I-Bestimmung. Technikon Symposium (1970). Sonderdruck Nr. R 863.
38. INGBAR, S.H.: The Interaction of the Thyroid Hormones with the Proteins of Human Plasma. Ann.N.Y. Acad. Sci. 86, 440 (1960).
39. INGBAR, S.H. and N.FREINKEL: Regulation of the Peripheral Metabolism of the Thyroid Hormones. Rec. Prog. Horm. Res., 16, 353 (1960).
40. KLEIN, E.: Der endogene Jodhaushalt des Menschen und seine Störungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1960).
41. KLEIN, E., H.-L.KRÜSKEMPER, D.REINWEIN, K.SCHWARZ und P.C.SCRIBA: Klassifikation der Schilddrüsenerkrankheiten. Dtsch. med. Wschr. 96, 752 (1971).
42. LANDGRAF, R.: Schilddrüsenfunktionsdiagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Bestimmung von L-Trijodthyronin an Serumproteine mittels Dextran-Gelfiltration. Dissertation, Wöllershof 1966.
43. LEYENDECKER, G., S.WARDLAW and W.NOCKE: Gamma Globulin Protection of Radioimmunoassay and Competitive Protein Binding Saturation Analysis of Steroids. J. clin. Endocr. 34, 430 (1972).

44. LUTZ, J.H. and R.J.GREGERMAN: pH Dependence of the Binding of Thyroxine to Präalbumin in Human Serum.
J. clin. Endocr. 29, 487 (1969).
45. MAN, F.B., D.M.KYDD and J.P.PETERS: Butanol extractable iodine of serum.
J. clin. Invest. 30, 531 (1951).
46. MACGREGOR, A.G. and A.R.SOMMER: The Anti-Thyroid Action of Para-aminosalicylic Acid.
The Lancet ii, 931 (1954).
47. MARSHALL, J.S. and J.PENSKY: Studies on Thyroxine-Binding Globulin (TBG). III. Some Physical Characteristics of TBG and its Interaction with Thyroxine.
Arch. Biochem. Biophys. 146, 76 (1971).
48. MURPHY, B.E.P.: Application of the Property of Protein-Binding to the Assay of Minute Quantities of Hormone and Other Substances.
Nature, 201, 679 (1964).
49. MURPHY, B.E.P.: Methodological Problems in Competitive Protein-Binding Techniques; the Use of Sephadex Column Chromatography to Separate Steroids.
Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 2nd Symposium Steroid Assay by Protein Binding.
March 1970.
50. MURPHY, B.E.P. and C.J.PATTEE: Determination of Thyroxine Utilizing the Property of Protein Binding.
J. clin. Endocr. 24, 187 (1964).

51. MURPHY, B.E.P., C.J. PATTEE and A. GOLD: Clinical Evaluation of a New Method for the Determination of Serum Thyroxine. J. clin. Endocr. 26, 247 (1966).
52. OPPENHEIMER, J.H. and R.R. TAVERNETTI: Studies on the Thyroxine-Diphenyl-hydantoin Interaction Effect of 5,5'-diphenylhydantoin on the Displacement of L-Thyroxine from Thyroxine-Binding Globuline (TBG). Endocrinology 71, 496 (1962).
53. PARMACIA FINE CHEMICALS - UPPSALA: Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis.
54. PICKARDT, C.R.: Stimulation der TSH-Sekretion durch TRH (Thyrotropin Releasing Hormone): Diagnostische Bedeutung und pathophysiologische Folgerungen. Habilitationsschrift. Medizinische Fakultät der Universität München, 1972.
55. PICKARDT, C.R., F. ERHARDT, J. GRÜNER, H.G. HEINZE, K. HORN und P.C. SCRIBA: Stimulierbarkeit der TSH-Sekretion durch TRH bei autonomen Adenomen der Schilddrüse. Dtsch. med. Wschr. 97 (1973).
56. PICKARDT, C.R., K. HORN und P.C. SCRIBA: Langzeitbehandlung mit Schilddrüsenhormonen nach Strumaresektion. Zeitschrift für Allgemeinmedizin/Der Landarzt, 6, 258 (1972).
57. PICKARDT, C.R., K. HORN und P.C. SCRIBA: Moderne Aspekte der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. Internist, 13, 133 (1972).

58. RICHTER, J., J. BECKEBANS, K. W. FREY, K. SCHWARZ und P. C. SCRIBA: Schilddrüsenfunktion bei sogenannter euthyreoter Struma.
Münchn. med. Wschr. 109, 2625 (1967).
59. ROBBINS, J. and J. E. RALL: Thyroxine-Binding Capacity of Serum in Normal Man.
J. clin. Invest. 34, 1324 and 1331 (1955).
60. RUHL, T.: Getrennte säulenchromatographische Bestimmung von T_3 und T_4 mittels mikrochemischer Jodbestimmung.
Dissertation in Vorbereitung.
61. RUHL, T., J. HABERMANN, K. HORN und P. C. SCRIBA: Separate Determination of Total T_3 and T_4 in Serum by a Semiautomatic Method.
Acta endocr. (Kbh) 155, 8 (1971).
62. SANTOS, M. A. and J. L. RABINOWITZ: L-Triiodothyronine Binding to Serum Proteine. Competition by Thyroxine (29072).
Proc. of in the Soc. for Experimental Biology and Med. 115, 901 (1964).
63. SCHWARZ, K. und P. C. SCRIBA: Diagnostik und Therapie der Schilddrüsenüberfunktion.
Med. Klin. 64, 469 (1969).
64. SCRIBA, P. C.: Die diagnostische Wertigkeit des Trijodthyronin-Tests.
Dtsch. med. Wschr. 94, 1455 (1969).
65. SCRIBA, P. C.: Zur klinischen Schilddrüsenfunktionsdiagnostik. Vergleich von Radiojodspeicherungstest, Bestimmung des proteingebundenen Jods und Bindung von Trijodthyronin an Serumproteine.
Münchn. med. Wschr. 108, 1609 (1966).

66. SCRIBA, P.C., H.BOROWZAK, F.ERHARDT, J.GRÜNER,
J.HABERMANN, H.G.HEINZE, K.HORN,
C.R.PICKARDT, M.RETTIG und T.RUHL:
Total Serum T_3 and T_4 TSH Response to TRH
Stimulation in Patients with Endemic Goiter.
Int. Sympos. d. endem. Kropfes,
Innsbruck 1972.
67. SCRIBA, P.C., H.G.HEINZE, R.LANDGRAF, K.W.FREY und
K.SCHWARZ: Klinische Bedeutung der Bestim-
mung der Bindung von Trijodthyronin an Se-
rumproteine mittels Dextrangelfiltration.
Klin. Wschr. 44, 131 (1966).
68. SCRIBA, P.C. und K.SCHWARZ: Endokrinologie
für die Praxis.
München, Lehmann 1970.
69. SPARAGANA, M., G.PHILLIPS and L.KRUCERA: Serum Thyroxine
by Competitive Protein Binding Analysis:
Clinical, Statistical and Comparative
Evaluation.
J. clin. Endocr. 29, 191 (1969).
70. STERLING, K., D.BELLABARBA, E.S.NEWMAN and M.A.BRENNER:
Determination of trijodthyronine concentra-
tion in human serum.
J. clin. Invest. 48, 1150 (1969).
71. STERLING, K., S.REFETOFF and H.A.SLENKOW: T_3 -Thyreo-
toxicosis: thyreotoxicosis due to elevated
serum triiodothyronine levels.
J. Amer. med. Ass. 213, 571 (1970).

72. STERLING, K., Ph. ROSEN and M. TABACHNICK: Equilibrium Dialysis Studies of the Binding of Thyroxine by Human Serum Albumin. J. Clin. Invest. 41, 1021 (1962).
73. TABACHNICK, M.: Thyroxine-Protein Interactions. III. Effect of Fatty Acids, 2,4-Dinitrophenol and Other Anionic Compounds on the Binding of Thyroxine by Human Serum Albumin. Arch. Biochem. Biophys. 106, 415 (1964).
74. TABACHNICK, M. and N. A. GIORGIO jr.: Thyroxine protein interactions. II. The Binding of thyroxine and its analogues to human serum albumin. Arch. Biochem. Biophys. 105, 563 (1964).
75. WEST, C. D., V. J. CHAVRE and M. WOLFE: A Serum Thyroxine Method: Application in Thyroid Disease and Jodine-Treated Patients. J. clin. Endocr. 25, 1189 (1965).
76. ZACH, O.: Zur Dextrangelchromatographie von Schilddrüsenhormonen. Dissertation, Univ. München (1970).

LEBENS LAUF

Ich wurde am 12.9.1948 als zweites Kind des Facharztes für Orthopädie Dr. Arthur Habermann und dessen Ehefrau Luise geb. Bämpfer in Frankfurt/Main geboren. Im Jahre 1951 zogen wir nach München, wo ich im September 1954 in die Grundschule eintrat. Nach vier Grundschuljahren besuchte ich nach bestandener Aufnahmeprüfung 1958 das Alte Realgymnasium, wo mir im Juli 1967 das Zeugnis der Reife zuerkannt wurde. Im Wintersemester 1967/68 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität München, wo ich im Sommer 1968 das Vorphysikum ablegte. Im Frühjahr 1970 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung. Im Juni 1973 habe ich das Medizinische Staatsexamen abgelegt.

